



(19) 대한민국특허청(KR)  
 (12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0098582  
 (43) 공개일자 2008년11월11일

(51) Int. Cl.

*A61L 2/18* (2006.01) *A61P 31/04* (2006.01)  
*A61L 101/20* (2006.01) *A61L 101/26* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-7014699

(22) 출원일자 2008년06월17일

심사청구일자 없음

번역문제출일자 2008년06월17일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2006/004285

국제출원일자 2006년11월17일

(87) 국제공개번호 WO 2007/057678

국제공개일자 2007년05월24일

(30) 우선권주장

0523427.3 2005년11월17일 영국(GB)

0617552.5 2006년09월07일 영국(GB)

(71) 출원인

레메디 리서치 리미티드

영국, 런던 이14 6피디, 1 파웨 스트리트, 블록  
에이, 스튜디오 5씨

(72) 발명자

히콕, 스티븐, 스파울딩

영국, 런던 더블유4 1유에이, 블렌하임 로드 8

(74) 대리인

최덕규, 이해진, 한태근, 장두령

전체 청구항 수 : 총 38 항

(54) 병원균 조절 생성물

### (57) 요 약

본 발명은 항균 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 (a) 수성 매질에서 용해되어 구리 이온을 형성할 수 있는 최소한 하나의 수용성 구리 화합물; (b) 수성 매질에서 용해되어 암모늄 이온을 형성할 수 있는 최소한 하나의 암모늄액; (c) 최소한 하나의 수용성 산; 및 (d) 상기 (a),(b) 및 (c)가 용해될 수 있는 수성 매질을 포함하며, (e) 산성 pH를 가지고, (f) 전해 포텐셜(electrolytic potential)이 50 밀리볼트를 초과하는 것을 특징으로 한다.

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- (a) 수성 매질에서 용해되어 구리 이온을 형성할 수 있는 최소한 하나의 수용성 구리 화합물;
- (b) 수성 매질에서 용해되어 암모늄 이온을 형성할 수 있는 최소한 하나의 암모늄액;
- (c) 최소한 하나의 수용성 산; 및
- (d) 상기 (a), (b) 및 (c)가 용해될 수 있는 수성 매질;

을 포함하고, (e) 산성 pH를 가지고, (f) 전해 포텐셜(electrolytic potential)이 50 밀리볼트를 초과하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a)는 황산구리, 염화구리, 질산구리와 같은 하나 이상의 무기 구리염을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 (b)는 최소한 하나의 무기 암모늄염 또는 수산화 암모늄을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서, 상기 (c)는 하나 이상의 염산, 황산, 질산 및 인산과 같은 무기산을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 5

제1항 내지 제3항중 어느 한 항에 있어서, 상기 (c)는 시트릭산, 말레산, 타르타릭산, 아세트산, 락틱산으로부터 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 산을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 매질은 순수 정제수를 포함하거나 필수적으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 7

제1항 내지 제6항중 어느 한 항에 있어서, 상기 (e) pH는 5 미만, 바람직하게는 4 미만, 보다 바람직하게는 3 미만, 가장 바람직하게는 2.5 미만인 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 8

제7항에 있어서, 상기 (e) pH는 2 또는 그 이하인 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 9

제1항 내지 제8항중 어느 한 항에 있어서, 상기 전해 포텐셜(f)은 100 밀리볼트를 초과하고, 바람직하게는 150 밀리볼트를 초과하고, 보다 바람직하게는 200 밀리볼트를 초과하고, 보다 더 바람직하게는 300 내지 400 밀리볼트와 같이 300 밀리볼트를 초과하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 10

제1항 내지 제9항중 어느 한 항에 있어서, 상기 수성 매질은 젤 베이스(gel base)를 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 11

제10항에 있어서, 상기 젤 베이스는 알로에베라 및 하나 이상의 농화제(thickener)를 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 12

제11항에 있어서, 상기 농화제는 최소한 하나의 잔탄 검(xanthan gum)을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 13

제10항 내지 제12항중 어느 한 항에 있어서, 상기 구리 화합물(a)은 유기염이고, 25 내지 500 ppm, 바람직하게는 50 내지 400 ppm, 더 바람직하게는 100 내지 350 ppm의 농도로 존재하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 14

제1항 내지 제13항중 어느 한 항에 있어서, 상기 언급한 성분으로 필수적으로 구성되는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 15

제14항에 있어서, 불가피한 불순물의 존재 가능성을 제외하고, 상기 언급한 성분으로 필수적으로 구성되는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 16

제1항 내지 제15항중 어느 한 항에 있어서, 상기 구리 화합물(a)은 결정 황산구리 수화물(hydrated crystalline copper sulphate)이며, 상기 산(c)은 황산, 염산 및 인산으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나를 포함하며, 상기 암모늄액(b)은 황산암모늄, 염화암모늄, 인산암모늄으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나를 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 17

제1항 내지 제16항중 어느 한 항에 있어서, 상기 항균 조성물은 박테리아의 성장 및/또는 증식을 조절하는 데에 사용하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 18

제17항에 있어서, 상기 박테리아는 처리하기 어려우며, 지속성(persistent) 박테리아인 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 19

제18항에 있어서, 상기 박테리아는 원내감염균(nosocomial bacteria)이거나 내성 박테리아인 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 20

제1항 내지 제19항중 어느 한 항에 있어서, 상기 항균 조성물은 박테리아 감염 또는 세균성 감염 치료용 약제의 제조에 사용하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 21

제20항에 있어서, 상기 박테리아는 처리하기 어렵거나 또는 원내감염균(nosocomial bacteria)이거나 내성박테리아와 같은 지속성(persistent) 박테리아인 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

### 청구항 22

제1항 내지 제21항중 어느 한 항의 항균 조성물을 항균성 조제에 사용하는 용도.

### 청구항 23

제1항 내지 제21항중 어느 한 항의 항균 조성물을 원내감염균(nosocomial bacteria)이나 내성박테리아와 같은 박테리아를 포함하는 물질(material) 또는 표면에 적용하여 박테리아를 포함하는 물질(material) 또는 표면을 치료하는 방법.

#### 청구항 24

제1항 내지 제21항중 어느 한 항의 항균 조성물에 최소한 하나의 세제가 조합된 항균 조성물.

#### 청구항 25

하나 이상의 세제와 제1항 내지 제21항중 어느 한 항의 항균 조성물이 결합된 세제 조성물.

#### 청구항 26

제1항 내지 제21항중 어느 한 항의 항균 조성물이 주입된(imregnated) 재료 기질.

#### 청구항 27

제26항에 있어서, 상기 재료 기질은 조직 재료(tissue material)인 것을 특징으로 하는 재료 기질.

#### 청구항 28

제26항에 있어서, 상기 재료 기질은 텍스타일(textile) 또는 패브릭(fabric) 재료인 것을 특징으로 하는 재료 기질.

#### 청구항 29

제28항에 있어서, 상기 재료 기질은 옷감 재료(cloth material)인 것을 특징으로 하는 재료 기질.

#### 청구항 30

제29항에 있어서, 상기 재료 기질은 극세사(microfibre) 옷감 재료인 것을 특징으로 하는 재료 기질.

#### 청구항 31

제30항에 있어서, 상기 재료 기질은 초극세사 옷감 재료인 것을 특징으로 하는 재료 기질.

#### 청구항 32

제1항 내지 제21항중 어느 한 항의 조성물 및 수용 가능한 캐리어(carrier), 희석제 또는 부형제를 포함하는 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

#### 청구항 33

제26항 내지 제31항중 어느 한 항의 재료 기질을 표면에 바르는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 표면을 소독하는 방법.

#### 청구항 34

제24항의 항균 조성물 또는 제25항의 세제 조성물을 사용하여 재료(material)를 세탁하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 박테리아를 포함하는 재료를 세탁하는 방법.

#### 청구항 35

제1항 내지 제21항중 어느 한 항에 있어서, 상기 항균 조성물은 크림, 비누, 세정액(wash), 스프레이 용액, 드레싱 용액(dressing solution), 세척액(irrigation solution) 또는 스프레이 미스트 조성액(spray mist formulation)의 형태인 것을 특징으로 하는 항균 조성물.

#### 청구항 36

제1항 내지 제21항 및 제35항중 어느 한 항의 항균 조성물을 표면에 미스트 혹은 포그(fog)상태로 스프레이하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 표면을 소독하는 방법,

**청구항 37**

- (i) 박테리아 검출;
  - (ii) 검출된 결과 표시;
  - (iii) 제1항 내지 제21항 및 제35항중 어느 한 항의 조성물을 표면에 바르거나 스프레이하여 검출된 박테리아의 처리; 및
  - (iv) 검출단계 반복 및 표시단계 반복;
- 을 수반하는 것을 특징으로 하는 박테리아 감염 조절 시스템.

**청구항 38**

제37항에 있어서, 상기 검출 단계(i)는 마이크로 유동학적 분석(micro fluidic assay)에 의해 수행하는 것을 특징으로 하는 박테리아 감염 조절 시스템.

**명세서**

&lt;1&gt;

**발명의 분야**

&lt;2&gt;

본 발명은 병원성 질병의 제어 및 감염을 유발하기 쉬운 병원종(pathogenic species)의 출현을 퇴치하는데 유용한 제형 및 그 밖의 생성물에 관한 것이다. 병원성 유기체(pathogenic organism)의 그룹은 세균(bacteria), 진균(fungus) 및 바이러스(virus)로 분류된다. 자유로운 상태(즉, 환경에서 나타날 수 있는 것과 같) 및 병원성 유기체가 숙주(host)의 체내에 침투하여 특정한 유기체와 관련된 질병의 징후를 유발하는 감염성 상태에서 병원성 유기체를 제어할 수 있는 항감염성제(anti-infective agents)와 살균제(disinfectants)에 대한 추구를 계속하는 것이 바람직하다.

&lt;3&gt;

**발명의 배경**

&lt;4&gt;

전형적으로, 병원성 유기체에 기인한 많은 질병 상태는 항생 물질, 일반적으로 이러한 감염을 치료하는데 사용되기 위하여 발견되고 상업화된 약품으로 치료된다. 병원 병동, 또는 진료소, 현장(theatre), 수술실 또는 유사한 환경에서, 상업적으로 입수할 수 있는 살균제는 병원균을 제어하고, 특히, 바닥, 벽, 세면기, 문 등과 같은 표면에 존재할 수 있는 세균과 같은 병원균을 없애거나 무해하게 만들기 위한 예방적인 조치로서 이용된다. 폭넓게 이용할 수 있는 이러한 살균제는 많으며 이들은 할로겐화되고/방향족 탄화수소에 기반하는 경향이 있다. 다른 화학적 형태 역시 알려져 있다.

&lt;5&gt;

상업적으로 입수할 수 있는 살균제는 또한 가정 및 사무실 환경, 예를 들어, 가정 및/또는 의료 종사자의 사무실에서 이용된다. 병원 내 또는 병원과 연계된 환경을 위한 감염 제어 시스템을 제공하는 것이 바람직하다.

&lt;6&gt;

그러나 최근 들어 항생물질 내성 병원성 균주(pathogenic strains), 예를 들어: MRSA (methicillin-resistant staphylococcus aureus, 메티실린-내성 황색 포도구균); VRE (vancomycin-resistant Enterococcus, 반코마이신-내성 장구균); 클래리스로마이신(clarithromycin), 아주 조금 확인된 메트로이디아졸(metronidazole)에 대해 내성인 헬리코박터 파이로리(Helicobacter pylori)의 출현에 대한 염려가 많다. 항생제-내성 세균은 이렇게 획득된 내성으로 인해 종래의 항생제로 치료하는데 어려움이 있다. 따라서 현재의 항생 약물 또는 아직 발견되지 않은 항생 약물에 의지하지 않는 대안적인 치료법 및 예방 체제(regime)를 제공하는 것이 바람직하다.

&lt;7&gt;

또한, 방향족 할로겐 살균제와 관련된 건강 염려가 많다. 그래서 할로겐화된 방향족 성분에 의지하지 않는 대안적인 살균제 및 항감염성제를 제공하는 것이 역시 바람직하다.

&lt;8&gt;

이전에 공개된 우리의 출원 WO 01/1554에서 조성물을 포함하는 메탈로-이온(metallo-ion)의 넓은 범위가 병원성 유기체를 치료하는데 유익할 수 있다는 것을 제안한 바 있다.

&lt;9&gt;

우리는 이제 놀랍게도 우리의 이전 상기 공개에서 개시된 조성물의 선택이, 항생제 내성 또는 치료나 제어가 어려운, 및/또는 병원, 수술실, 진료소 및 현장, 가정 및 환경에서 존재할 수 있는 특정 병원성 유기체를 살아있는 인간 세포에 상당한 상해 또는 해로운 효과를 주지 않은 치료 체제 하에서 퇴치하는데 유용하다는 것을 알게 되었다. 우리는 또한 우리의 이전 상기 공개에서 개시된 것들과 유사하지만 다른 조성물에서의 이러한 유용한 효과를 알게 되었다. 우리는 또한 놀랍게도 기재(substrate)가 본원에서 설명되는 조성물로 함침되어(imregnated), 대단히 우수하고 오래 지속되는 향세균성의 특성을 제공한다는 것을 알게 되었다. 예를 들어,

우리는 병원 표면을 청소하기 위하여 최근에 상업적으로 입수할 수 있는 것과 같은 극세사(microfibre) 및/또는 초극세사 천이 본원에서 설명되는 조성물로 함침될 수 있고, 강력하게 낮은 범위의 항세균성 및/또는 항진균성 살균 보조구로 사용될 수 있다는 것을 알게 되었다. 우리는 또한 이러한 극세사 천이 세탁되고, 다시 함침되며, 여러번 재사용될 수 있어, 상당한 경제적인 이익을 제공한다는 것을 알게 되었다.

<10> 우리는 또한 뜨밖에도 본원에서 설명되는 이온적으로 변경된 구리-함유 조성물이 다양한 다른 병원균에 대해 효과적이고, 동시에 이러한 다양한 다른 병원성 유기체에 의해 감염 및 재감염되는 것에 대한 보호를 제공할 수 있다는 것을 알게 되었다.

#### 발명의 구체예에 대한 상세한 설명

<12> 본원에서 설명되는 조성물은 감염을 겪는 환자에 국부적으로 적용될 수 있다. 예를 들어, MRSA 및/또는 VRE를 예방 또는 치료하기 위하여 환자의 피부에 국부적으로 적용됨.

<13> 우리는 나아가 표면 위 또는 공기 중의 환경에서 바람직하게 마이크로 유체 검정(assay)에 의해 적어도 하나의 병원성 유기체의 존재를 탐지, 탐지 결과의 표시 또는 다른 제시(presentation), 탐지된 병원종의 치료, 상기 표면 또는 공기 중의 환경에 본원에서 설명되는 종류의 하나 또는 그 이상의 조성물의 적용, 상기 탐지 단계의 반복 및 상기 표시 단계의 반복에 기반한 감염 제어 시스템을 개발하였다.

<14> 상기 조성물은 병원종을 퇴치하기 위하여 스프레이 분무(mist), 미세 분무 또는 안개로 사용되거나 적용될 수 있다. 이러한 적용에서, 살균제로서 작용하는 상기 조성물은 물방울 위에 흘러지고, 이후 이것이 노출된 및/또는 숨겨진 표면을 덮기 위하여 미세 스프레이 또는 분무로서 적용되고, 건물 내부의 틈 및 균열로 들어간다. 일단 표면 상에서, 착화된(complexed) 구리 이온의 살균 특성은 효과적이고 상당한 시간동안 지속된다. 스프레이의 다양한 배합이 사용될 수 있고, 물방울의 크기 및 적용된 조성물의 농도는 다양하다. 계면 활성제가 이러한 목적을 위하여 이들 조성물에 포함될 수 있다.

<15> 본 발명은 또한 구리 함유 조성물을 함유하는 세제 조성물을 포함한다. 특히, 이러한 세제는 감염을 겪는 환자와 접촉하는 의료 종사자 또는 다른 사람들이 입은 의류를 세탁하기 위해 사용될 때, 살균성이 되고, 세균 및 약물 내성 세균과 같은 병원종을 제어할 수 있게 된다. 유사하게, 이러한 살균성 세제는 감염을 겪는 환자의 의류 및 침구류를 세탁하기 위하여 사용될 수 있다.

<16> 하기에서 설명되는 조성물은 몇몇 경우에 낮은 범위에서 시작하는 전해 전압(electrolytic potential)을 얻기 위하여, 예를 들어, 최소한 150 mVolts 만큼 높은, 그러나 몇몇 구체예에는 350 mV임, 산의 첨가가 제한되는 것을 제외하고 상기에서 참조된 우리의 특허 출원에 약술된 일반적인 절차에 따라 용이하게 제조될 수 있다. 추가 성분이 존재하는 경우, 예를 들어, 항감염성 생성물을 표면 세척하는데 도움이 되는 계면 활성제, 이들은 표 안에 표시된다.

#### 표 1

구체예	화합물/량	암모늄제/량	산/량	첨가제	최종 pH	전해압
1	황산구리/150g	황산암모늄 75g 98% 변이체	황산 98% 변이체	없음	<2	>150
2	황산구리/150g	"	"	없음	<2	>300
3	황산구리/200g	"	"	없음	1.5	>150
4	황산구리/150g	인산암모늄 75g 변이체	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 변이체	없음	1-2	>150
5	황산구리/150g	염화암모늄 75g 변이체	농축 HCl 변이체	없음	<2	>150
6	황산구리/200g	황산암모늄 75g 변이체	농축 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 변이체	없음	<2	>150
7	황산구리/150g	염화암모늄 75g 변이체	농축 HCl 변이체	없음	<2	>300
8	황산구리/300g	황산암모늄 82.5g 변이체	농축 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 변이체	없음	>2	>150
9	황산구리/150g	황산암모늄 75g 변이체	농축 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 변이체	계면 활성제	<2	>150

<17>

<18> 다른 구체예에서는 구리의 낮은 농도, 예를 들어, 다른 성분에 대해 동일한 양이 주어진다면, 황산 구리(copper

sulphate)의 90 내지 130g 또는 100 내지 120g 과 같이 80 내지 140g이 바람직하다. 이들은 국부적인 적용 및 *H.pylori* 감염에 대해 유용할 수 있다.

- <19> 상기 표에서, 상기 조성물은, 구리가 용해된 암모늄제로부터의 수성 암모늄 이온의 존재하에서 및 이와 잠재적으로 결합된 메탈로 이온으로서 존재하는, 구리-함유 수요액으로서 존재하고, 상기 조성물은 몇몇 바람직한 구체예에서는 적어도 350 mV와 같이, 300 mV를 넘지만, 적어도 150 mV의 명백한 전해 전압을 나타낸다. 우리는 놀랍게도 상술한 조성물이 100 ppm 미만, 예를 들어 50 ppm의 농도로 *E. coil* 세포의 배양에 적용될 때, 치료하기 어려운 끈질긴 균주(strains)인 *E. coil*와 같은 세균성 균주(bacterial strains)에 대해 대단히 효과적이라는 것을 알게 되었다. 그러나, 몇몇 구체예에서는 등가 구리(equivalent copper)의 최고 1000 ppm 농도가 고려된다.
- <20> 조성물 내에서 구리의 당량 농도는 10 내지 50 g/Litre, 바람직하게 20 내지 40 g/Litre, 보다 바람직하게, 25 내지 35 g/Litre인 것이 바람직하고, 용매 상은 종류(탈이온과 대조됨) 수이다.
- <21> 목표 병원성 유기체는 주위 온도에서, 1분 내지 12시간, 또는 1분 내지 6시간 또는 0.25에서 3.0시간의 기간 동안, 등가 구리를 0.01 내지 100 ppm의 범위 내에서 포함하는 조성물로 치료되는 것이 바람직하다. 그러나 스프레이/안개 치료의 경우에, 스프레이가 짧은 시간동안 적용되기 때문에 적용 시간이 훨씬 더 짧아질 수 있다.
- <22> 구리 조성물은 위/소화성 궤양의 주요 원인인 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 및 약물 내성 헬리코박터 파이로리에 대하여, 0.5 내지 500 ppm의 등가 구리로 사용될 수 있다. 특히 구리 조성물에 의해 치료될 수 있는 저항성 균주는 클래리스로마이신 내성 *H. pylori*, 메트로니다졸 내성 *H. pylori* 및 (드물지만) 아목시실린 내성 *H. pylori*이다.
- <23> 구리 조성물은 크림, 젤, 및 피부 및 점막 표면, 함침된 붕대 및 관류액(irrigation solution)에 적용될 수 있는 스프레이 용액과 같은 국부성 제형으로 제형화될 수 있다.
- <24> 구리 조성물은 표면을 살균하도록, 표면 세척에 유용한 흡수성 기재를 함침시키는데 사용될 수 있다. 바람직한 기재는 존슨 다이버시티 사(Johnson Diversity, Inc.)로부터 입수 할 수 있는 극세사 및/또는 초극세사(UMF) 천으로 불린다. 앞서 예시된 바와 같이, 이러한 함침된 극세사 천은 세탁될 수 있고 여러차례 재사용될 수 있다. 함침된 이러한 천은 세균의 성장 및/또는 발육(development)을 제어할 수 있는 용이한 수단, 예를 들어, 세균의 성장 및/또는 발육 억제, 예를 들어, 세균의 성장 및/또는 복제 억제 또는 최소한 이러한 박테리아의 세균성 활성 억제를 제공한다. 본 발명은 넓은 범위에서 어떠한 항균성제로 함침된 극세사 기재를 충분하게 포함하면서, 또한 상기 표에서 유래된 구리 조성물로 함침된 이러한 극세사 기재의 구체예 또는 본 발명의 범위 안 속하는 것과 같은 구리-함유 조성물에 따른 다른 것을 포함한다.
- <25> 극세사 또는 초극세사 천과 같은 기재에 구리 베이스 메탈로-이온 살생제(biocide)를 섞는 것의 이점은 이것이 없다면 진짜 위험한 표면의 교차 오염을 방지할 수 있다는 것이다.
- <26> 특히, 이러한 함침된 극세사 천은 치료하기 어려운 병원내 감염(noscomial hospital infection) MRSA (야생 균주), ACCB (야생 균주), VRE (야생 균주), C. diff (포자 혼탁액), 실질적으로 본원에서 정의된 것과 같은 LPn (*Legionella*, 레지오넬라) 및 살모넬라(*Salmonella*)에 대해서 표면(예를 들어, 병원, 수술실, 친료실, 현장과 같은 곳)을 살균하기 위하여 사용될 수 있다.
- <27> 본 조성물 및 이로 함침된 기재는 세균성 활성의 매우 실질적이고 상당한 억제를 제공할 수 있다. 즉, 본 조성물 및 이로 함침된 기재는 종래의 항생 물질 및/또는 종래의 살균 체제로 지금까지는 치료하기 어려운 병원에서 감염되는 병원성 세균의 성장, 발육 및/또는 복제를 방해할 수 있고, 이에 의해 병원에서 감염되는 병원성 세균의 성장, 발육 및/또는 복제를 제어할 수 있다. 세균의 병원성 활성의 이러한 억제는 놀랍게도 널리퍼진 주변 인간 세포에 대해 현저하게 수반하는 세포독성 없이 달성될 수 있다.
- <28> 본 발명은 첨부된 청구항에서 정의된다.
- <29> 본 발명이 예시되고, 보다 쉽게 이해되며, 당업자에 의해 용이하게 실시될 수 있도록, 본 발명의 구체예들은 비한정적인 실시예에 의해 제시될 것이고, 첨부된 도면을 참조로 설명될 것이다.
- <30> **도면의 간단한 설명**
- <31> 도 1은 비교를 위하여 조성물, 구리염 단독 및 조성물의 잔류하는 성분에 대한 20 ppm 등가 구리에서, MRSA 시간-사멸 곡선을 나타낸다.

- <32> 도 2는 150 ppm의 등가 구리에서, 도 1과 유사한 MRSA 시간-사멸 곡선을 나타낸다.
- <33> 도 3은 40 ppm에서, 도 1과 유사한 ACCB 시간-사멸 곡선을 나타낸다.
- <34> 도 4는 150 ppm에서, 도 3과 유사한 ACCB 시간-사멸 곡선을 나타낸다.
- <35> 도 5는 표준 EN 12054 프로토콜을 사용하는 MRSA 박테리아의 생존 상에서 CuAL42 [▲] and Purell™ [■] 핸드 젤을 함유하는 제형화된 X-gel 수성 매체의 항균성 효과를 도시한다.
- <36> 도 6은 도 5와 유사한 그래프로, ACCB의 생존 상에서 동일한 제형을 사용한 효과를 도시한다.
- <37> 도 7은 도 5 및 6과 유사한 그래프로, C.diff(포자)의 생존 상에서 동일한 제형을 사용한 효과를 도시한다.
- <38> 도 8A 내지 8D는 인간의 장상피 HT-29 세포 상에서 3개의 구리 제형 및 황산 구리 단독 [□]의 세포 독성 효과를 나타내는 그래프이다.
- <39> 도 9A 내지 9D는 도 8A 내지 8D와 유사한 그래프로, 인간의 단핵성 림프종 U937 세포 상에서 3개의 구리 제형 및 황산 구리 단독 [□]의 세포 독성 효과를 나타내는 그래프이다.
- <40> 도 10 내지 14는 H. pylori 실시예 12와 관련된 예시된 구리 제형의 효과를 나타내는 그래프로, AL은 CuAL42에 대한 약자로 사용되며, PC는 CuPC33에 대한 약자이고, 농도는 ppm으로 주어졌으며, 0은 컨트롤을 나타낸다.
- <41> 도 15는 CuAL42로 코드화되고 예시된 구리 제형 및 당뇨 족부 궤양과 관련된 8개의 세균성 마이크로-유기체로 얻어진 억제 영역을 나타낸다.
- <42> 도 16은 도 15와 유사한 억제 영역을 나타내며, 다만 CuWB50으로 코드화된 구리 항균성 조성물을 이용한 것이다.
- <43> 도 17 내지 19는 치료하기 어렵고 및/또는 항생제 내성인 다양한 세균에 대해, 낮은 투약량(1 ppm)에서 3개의 구리 조성물의 시간-사멸 곡선을 나타내는 그래프이다.
- <44> 도 20은 실시예 13과 관련된 핸드 젤 잔류물의 항-MRSA 활성을 나타내는 것으로, 본 발명(X-gel)에 따른 젤 타입 수성 매체가 상업적으로 입수할 수 있는 제품과 비교된다.
- <45> 도 21은 실시예 14와 관련하여 3개의 제형화된 구리 항균성 조성물로 함침된 MRSA-감염 UMF(초극세사) 천의 살균을 나타낸다.
- <46> 도 22는 실시예 15에서 설명한 것과 같은 다른 관련된 제품과 A431 인간 피부 세포 라인에 대한 핸드 젤 세포 독성의 비교를 나타낸다.
- <47>
- <48> 실시예 1
- <49> 도입: 표 1의 구체예 1 내지 8에 따라 얻어진 CuAL42, CuPC33 및 CuWB50으로 코드화된 3개의 구리 메탈로-이온 제형의 하기 목표 유기체에 대한 활성을 시험하였다. 메티실린 내성 스파필로코쿠스 아우레우스 (Methicillin resistant Staphylococcus aureus, MRSA); 아시네토박ter 캘코아세티쿠스- 바우마니 (Acinetobacter calcoaceticus- baumanii, ACCB); 엔테로코커스 속(Enterococcus sp. 반코마이신 내성; VRE); 클로스트리디움 디피실레(Clostridium difficile)의 포자; 레지오넬라 뉴모필라(Legionella pneumophila).
- <50> 종류수로 희석하기 전에, 3개의 메탈로-이온 제형 스택(stock) 용액 각각에서 등가 원소 구리의 농도는 30.43 g/L이었다. 3개의 구리 제형 스택 용액을 탈이온수로 충분히 희석하였고, 이후 로그 상태 성장에 있는 미생물에 대해 등가 원소 구리의 0.25, 0.5 및 1.0 ppm의 최종 희석 농도에서 실험하였다. 또한 정지 상태 미생물에 대해 1 ppm에서 동일한 조성물을 실험하였다.
- <51> 약어: ACCB, 아시네토박ter 캘코아세티쿠스- 바우마니(Acinetobacter calcoaceticus-baumanii); MRSA, 메티실린 내성 스파필로코쿠스 아우레우스 (Methicillin resistant Staphylococcus aureus); PBS, 인산염-완충 염수 (phosphate-buffered saline); VRE, 엔테로코커스 속(반코마이신 내성) (Enterococcus sp., (vancomycin resistant)).
- <52> 재료 및 방법:
- <53> 혈액 한천(Blood agar), 양분 배양액(nutrient broth) 및 BYCE 매체는 Oxoid Ltd (UK)로부터 구매하였다.

MRSA, ACCB 및 VRE를 혈액 한천 상에서 순수하게 배양하여 길렀고, 하나의 콜로니를 양분 배양액으로 옮기고, 37°C에서 6시간 동안 흔들면서 배양하였다.

- <54> 이후 상기 6시간의 양분 배양액(로그 상태 셀)을 원심분리하여 세포를 침전시키고, 배양액을 버리고, 세균 세포를 세척하고, pH 7.2의 인산염 완충 염수(PBS)를 이용하여 3회 원심분리하였다. PBS 중에 최종 혼탁액이 만들어졌고, 생균 세포 수를 실험을 위하여 필요한 접종원( $1.5 \times 10^8$ )으로 조절하였다. 이후 이 세포들은 0.25, 0.5 및 1.0 ppm의 최종 농도에서 예시된 구리 체형에 노출되었다.
- <55> 15, 30, 60 및 120 분에서 이들 배양균으로부터 샘플을 채취하였고 마일스 및 미스라 테크닉(Miles and Misra technique)을 통해 생균 수를 결정하였다. 15 및 120 분에서 접종원의 생존력 및 안정성을 확인하기 위하여 PBS 샘플의 컨트롤 배양을 실시하였다.
- <56> 상기 실시예는 24시간 한천 배지로부터 세포를 채취하고, 처음 PBS 세척 후 이를 직접 PBS에 넣어 혼탁시키고  $1.5 \times 10^8$  cells/ml로 조정되어 접종된 정지 상태 셀을 이용하여 1.0 ppm에서 반복되었다.
- <57> Clostridium Difficile 포자 서스펜션 혼탁액은 50:50의 알코올-염류에서 혐기성으로 배양되는 블러드 아가(blood agar)상에서 5일간의 미생물 배양을 중지함으로써 만들어 진다. 그 다음으로, 마일즈 앤 미스라 카운트(Miles and Misra Count)가 최종 농도의 생존 포자(viable spores) 및 테스트를 위해  $5 \times 10^6$  cell/ml로 최종적으로 적응된 inoculum을 결정하기 위해서 서스펜션에 대해서 수행된다.
- <58> Legionella pneumophila 서스펜션은 PBS내의 BCYE 매체 상에서 5일간의 배양으로 만들어 지며, 생균수 측정(viable count)이 서스펜션을  $5 \times 10^6$  cell/ml로 적응시키기 위해서 사용된다.
- <59> 세 가지 구리 포뮬레이션(formulation)은 철린지 이노쿨라(challenge inocula)로서 영양이 풍부한 배양액(nutrient broth)에서 6시간의 배양을 사용하여 MRSA, ACCB, 및 VRE에 대해서 테스트된다.
- <60> 결과: 세 가지 구리 포뮬레이션 모두 - CuAL42(표 A), CuPC33(표 2), 및 CuWB50(표 3)는 용량-의존적인(dose-dependent) 방식으로 박테리아의 수를 감소시켰다. 1ppm의 농도에서, 모든 3가지의 구리 포뮬레이션들은 MRSA, ACCB, 및 VRE의 세 log inhibition의 주위에서 달성된다. CuAL42 및 CuPC33은 C. difficile 포자의 두 log inhibition을 제공하는데 반해, CuWB50은 세 개의 log inhibition을 제공한다.
- <61> CuAL42 및 CuWB50은 Legionella pneumophila의 두 log inhibition을 제공하고, CuPC33는 약 세 log inhibition을 제공한다.
- <62> 표 4에서와 같이, 상기 3가지 구리 포뮬레이션의 inhibitory effect는 MRSA, ACCB, 및 VRE를 사용할 때 로그 단계(log phase) 와 스테이션리 단계(stationery phase) 모두에 대해서 유사하다.
- <63> 다른 실험에서, 박테리아는 PBS 내에서 성장되며, 상당한 살균 효과가 관찰된다. 표 5에서 보는 바와 같이, MRSA, ACCB, 및 VRE는 영양이 풍부한 배양액에서 성장될 때 살균효과에 덜 민감했는데, 이는 단백질 또는 다른 콤포넌트(components)가 구리 포뮬레이션의 활동을 방해한다는 것을 암시한다. C. difficile과 Legionella pneumophila는 박테리아의 성장을 얻는데 기술적인 어려움 때문에 영양이 풍부한 배양액에서 테스트되지 않는다.
- <64> 토론: 상기 제공된 결과는 3가지 구리 포뮬레이션 모두가 1ppm 까지의 농도에서 병원성 박테리아에 매우 살균효과가 크다는 것을 보여준다. 하지만, 이러한 활동은 박테리아가 영양이 풍부한 배양액에서 성장될 때 다소 완화되는데 이는 단백질 또는 배양액의 다른 콤포넌트들이 구리 포뮬레이션의 효능을 감소시킨다는 것을 암시한다.
- <65> 흥미롭게, 구리 포뮬레이션은 단지 정적인 효과보다 박테리아 세포에 대해 세포독성적 효과를 제안하면서 성장하는 박테리아 및 정지 상태의 박테리아에 대해 대단히 활성적이다.
- <66> 우리는 1 ppm의 CuAL42에 대해 노출되면 10 일동안 CuAL42의 0.1 ppm의 존재 하에서 MRSA 성장이 100% 사멸되는 것을 밝혔다.
- <67> [표A] CuAL42(황산구리/황산암모늄/황산) 처리시 시간에 따른 균생존수

&lt;68&gt; (a) MRSA (야생균주)

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1.5 \times 10^8$	-	-	$1.5 \times 10^8$
0.25	$9 \times 10^7$	$9 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$2 \times 10^6$
0.5	$8 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^6$
1.0	$4 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$5 \times 10^5$	$4 \times 10^5$

<70> (b) *Acinetobacter* (야생균주)

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1.5 \times 10^8$	-	-	$1.5 \times 10^8$
0.25	$9 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
0.5	$7 \times 10^7$	$9 \times 10^6$	$1 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
1.0	$3 \times 10^7$	$4 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$5 \times 10^5$

<72> (c) *Clostridium difficile* 포자현탁액

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$4 \times 10^5$	-	-	$4 \times 10^5$
0.25	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$
0.5	$4 \times 10^5$	$3 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
1.0	$2.5 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$16 \times 10^3$

&lt;74&gt; (d) 벤코마이신 내성 장구균(야생균주)

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1 \times 10^7$	-	-	$10^7$
0.25	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
0.5	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
1.0	$1 \times 10^5$	$1.5 \times 10^4$	$2.5 \times 10^3$	$1 \times 10^3$

<76> (e) *Legionella pneumophila* NCTC

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$5 \times 10^6$	-	-	$5 \times 10^6$
0.25	$2 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$6 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$
0.5	$1 \times 10^5$	$9.5 \times 10^4$	$7.5 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$
1.0	$1 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$	$7.5 \times 10^4$	$4 \times 10^4$

&lt;78&gt; 표 2. CuWB50(황산구리/염화암모늄/염산) 처리시 시간에 따른 균생존수

&lt;79&gt; (a) MRSA (야생균주)

&lt;80&gt;

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1.5 \times 10^8$	-	-	$1.5 \times 10^8$
0.25	$5 \times 10^7$	$9 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
0.5	$3 \times 10^7$	$8 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
1.0	$4.5 \times 10^7$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$3 \times 10^5$

<81> (b) *Acinetobacter* (야생균주)

&lt;82&gt;

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1.5 \times 10^8$	-	-	$1.5 \times 10^8$
0.25	$9 \times 10^7$	$7 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$9 \times 10^6$
0.5	$9 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$9 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
1.0	$5 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$5 \times 10^5$	$9 \times 10^4$

<83> (c) *Clostridium difficile* 포자현탁액

&lt;84&gt;

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$4 \times 10^5$	-	-	$4 \times 10^5$
0.25	$1.5 \times 10^4$	$6 \times 10^3$	$6 \times 10^2$	$4 \times 10^2$
0.5	$12 \times 10^3$	$3 \times 10^3$	$4.5 \times 10^2$	$3.5 \times 10^2$
1.0	$6.5 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$3.5 \times 10^2$	$3.5 \times 10^2$

&lt;85&gt; (d) 벤코마이신 내성 장구균(야생균주)

&lt;86&gt;

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$10^7$	-	-	$10^7$
0.25	$11 \times 10^6$	$8.5 \times 10^6$	$12 \times 10^5$	$12 \times 10^5$
0.5	$8.5 \times 10^6$	$6 \times 10^6$	$12 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$
1.0	$2.5 \times 10^6$	$3.5 \times 10^6$	$7.5 \times 10^5$	$7 \times 10^4$

<87> (e) *Legionella pneumophila* NCTC

&lt;88&gt;

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$5 \times 10^6$	-	-	$5 \times 10^6$
0.25	$8 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$2 \times 10^5$
0.5	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$7.5 \times 10^4$
1.0	$3 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$2.5 \times 10^4$

&lt;89&gt; 표 3. CuPC33(황산구리/인산암모늄/인산) 처리시 시간에 따른 균생존수

&lt;90&gt; (a) MRSA (야생균주)

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1.5 \times 10^8$	-	-	$1.5 \times 10^8$
0.25	$7 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$8 \times 10^6$	$1 \times 10^6$
0.5	$6 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
1.0	$4.5 \times 10^7$	$2.5 \times 10^7$	$9 \times 10^6$	$3 \times 10^5$

<92> (b) *Acinetobacter* (야생균주)

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1.5 \times 10^8$	-	-	$1.5 \times 10^8$
0.25	$9 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$2 \times 10^6$
0.5	$5 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$8 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
1.0	$2.5 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^6$	$5 \times 10^5$

<94> (c) *Clostridium difficile* 포자현탁액

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$4 \times 10^5$	-	-	$4 \times 10^5$
0.25	$3.5 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$1 \times 10^3$
0.5	$3.5 \times 10^4$	$2 \times 10^4$	$9.5 \times 10^3$	$2 \times 10^3$
1.0	$2 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3$	$1 \times 10^3$	$1 \times 10^3$

&lt;96&gt; (d) 벤코마이신 내성 장구균(야생균주)

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$1 \times 10^7$	-	-	$1 \times 10^7$
0.25	$1.4 \times 10^6$	$1.2 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$
0.5	$1.4 \times 10^6$	$8.5 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$5 \times 10^4$
1.0	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$2 \times 10^4$

<98> (e) *Legionella pneumophila* NCTC

농도(ppm)	15분	30분	60분	120분
control	$5 \times 10^6$	-	-	$5 \times 10^6$
0.25	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$2 \times 10^4$
0.5	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^4$
1.0	$3 \times 10^4$	$3 \times 10^4$	$1 \times 10^4$	$8 \times 10^3$

&lt;100&gt; 표 4. 정상기의 박테리아에 대한 3종류의 구리화합물(1ppm)의 효과

	15 min	30 min	60 min	120 min
<b>Inoculum</b>				
			<b>CuAL42</b>	
MRSA $10^8$	$6 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$4 \times 10^6$	$3 \times 10^5$
ACCB $10^8$	$5 \times 10^7$	$8 \times 10^6$	$7 \times 10^5$	$5 \times 10^5$
VRE $10^7$	$5 \times 10^6$	$3 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	$7 \times 10^4$
<b>Inoculum</b>				
			<b>CuWB50</b>	
MRSA $10^8$	$5 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^5$
ACCB $10^8$	$4 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$8 \times 10^5$	$1 \times 10^5$
VRE $10^7$	$2 \times 10^6$	$1 \times 10^5$	$7 \times 10^5$	$9 \times 10^4$
<b>Inoculum</b>				
			<b>CuPC33</b>	
MRSA $10^8$	$4 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$8 \times 10^5$
ACCB $10^8$	$3 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$6 \times 10^6$	$8 \times 10^5$
VRE $10^7$	$6 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	$8 \times 10^4$

&lt;101&gt; &lt;102&gt; 표 5. 영양배지에서 성장한 박테리아에 대한 3종류의 구리화합물(1ppm)의 효과

	15 min	30 min	60 min	120 min
<b>CuAL42</b>				
MRSA	$8 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	$6 \times 10^7$
ACCB	$6 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$8 \times 10^6$
VRE	$4 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
<b>CuWB50</b>				
MRSA	$7 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$4 \times 10^6$
ACCB	$4 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$8 \times 10^6$
VRE	$5 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$8 \times 10^6$	$6 \times 10^6$
<b>CuPC33</b>				
MRSA	$5 \times 10^7$	$3 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$1 \times 10^7$
ACCB	$6 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	$9 \times 10^6$
VRE	$6 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	$7 \times 10^6$

<103> Initial inoculum =  $10^8$  CFU/ml

&lt;104&gt; 실시예 2

<105> 도입: 일반적인 환경의 병원표면으로부터(라미네이트된 워크탑 표면) 초극세사 섬유(UMF) 속으로 흡수되고 생존 가능한 박테리아 (MRSA, ACCB or C diff)의 높은 레벨의 이노클라를 제거하기 위해 이용된 표 1의 구체예 (embodiment) 1 내지 8에 따라서 획득된 CuAL42, CuPC33 and CuWB50로 코드된 같은 세 개의 metallo-ion(copper) 포뮬레이션이 그들의 박테리아 성분에 대하여 조사되었다.

<106> 약어: ACCB, Acinetobacter calcoaceticus-baumanii, C diff, Clostridium difficile (spores); MRSA, methicillin-resistant Staphylococcus aureus; PBS, phosphate buffered saline; ppm, parts per million; UMF, ultramicrofibre cloth.

<107> 재료 및 방법: 본 연구에 이용된 MRSA, ACCB 및 C diff (spores) 미생물들은 임상적 분리주이다.

<108> 라미네이트된 표면(laminated surface)은  $100 \text{ cm}^2$ 의 영역에 걸쳐 무균 플랫 스프레더를 이용해 펼쳐지고 건조된 MRSA or ACCB의  $2 \times 10^5$  콜로니 포밍 유닛(cfu) 또는 C diff의  $3 \times 10^5$  spores/ml of  $100 \mu\text{l}$ 의 포스페이트 완충용액(PBS)에 접촉되었다. 상기 영역의 건조 후에 이노클럼의 생존능력을 확실히 하기 위하여 컨택트 플레이트 되었다(contact plated).

<109> 상기 영역은 그런 다음 무균수(대조구)로 적시거나 또는 최종농도 75ppm인 각각의 구리 포뮬레이션으로 적시거나 하여 습기의 권고된 제한사항에 따라 축축해진 UMF로 닦아졌다.

<110> 그런 다음 상기 영역은 UMF에 의해 이노클럼의 제거를 평가하기 위해 다시 컨택트 플레이트되었다. 상기 UMF는 그런 다음 창고에 있는 세탁물이나 고정된 스토리지에 여행하는 것을 시뮬레이션하기 위해 미니-그립 백에 넣어져서 실온에서 16시간동안 방치된다. 16시간 후에 상기 UMF는 100ml의 PBS에 넣어지고 Stomacher (Seward Ltd, UK)에 넣어져서 3분간 250 rpm의 속도로 격렬하게 흔들어졌다.

- <111> 생존가능한 카운트(viable counts)가 용리액 및 3500rpm의 속도로 10분간 원심분리된 10ml의 용리액 및 블러드 아가 위에서 배양된 침전물(deposit)에서 수행되었다.
- <112> 보드의 백그라운드 카운트(background count of the boards) 및 PBS의 카운트가 환경적 오염에 대하여 테스트되었다. 그 결과는 세 개의 분리된 런(run)의 평균이다.
- <113> 결과: 표6에서 보듯이, 컨택트 플레이팅(contact plating)은 UMF에 의해 매우 효과적으로 제거된 무거운 생존가능한 이노쿨럼(heavy viable inoculum)을 밝혀주었다. 그러나, 구리 포뮬레이션이 없는 상태에서, 박테리아는 UMF 천 위에 생존가능하게 남아있다. UMF-Cu 포뮬레이션이 담긴 천의 Stomacher 용리액으로부터 Acinetobacter 또는 C. difficile 박테리아는 살아남을 수 없었다.
- <114> 디스커션: 이러한 연구는 구리 계의 항-박테리아 포뮬레이션을 포함하는 것 및 포함하지 않는 오염된 표면을 닦기 위해 극세사 천의 능력을 조사하였다. UMF 천이 표면으로부터 박테리아를 제거하는데 매우 효과적임을 보여준 반면, 최소 16시간 동안 천에 생존가능한 박테리아가 남아있었다. UMF 천이 미리 3개의 구리계 포뮬레이션으로 처리된 경우에는 클리닝 효율은 바꿔지지 않았지만, 천 위에 박테리아 생존은 ACCB 및 C diff spore에 대하여 철저하게 방지되었고 MRSA에 대해서는 4 로그만큼 감소하였다. 이러한 결과는 UMF 천이 오염된 표면을 청소하는데 매우 효과적임을 보여주지만, 본 발명의 실시예에 따라 구리계 항-박테리아 포뮬레이션으로 천을 미리 처리한 경우에는 천 위에서 이러한 병원성 박테리아의 생존을 현저하게 줄일 수 있고, 이는 병원이나 가정에 커다란 이익이 될 수 있음을 보여준다.

표 6. 구리 기초 항박테리아 화합물을 함유한 UMF 천 및 함유하지 않은 UMF 천으로 오염된 표면의 세척

Copper composition (75 ppm) and bacteria used	Cfu's detected with contact plates		Stomacher eluent from UMF/Cu after 16 hr at room temperature	Board surface control*	PBS control**	Inoculum used per 100 cm <sup>2</sup>
	Pre-clean	Post-clean				
<b>CuAl42</b>						
MRSA	>500	0	6.6 X 10 <sup>2</sup>	0	0	2 X 10 <sup>6</sup>
ACCB	>500	0	0	0	0	2 X 10 <sup>6</sup>
CD spores	>500	0	0	0	0	3 X 10 <sup>6</sup>
<b>CuPC33</b>						
MRSA	>500	0	6.6 X 10 <sup>2</sup>	0	0	2 X 10 <sup>6</sup>
ACCB	>500	0	0	0	0	2 X 10 <sup>6</sup>
CD spores	>500	0	0	0	0	3 X 10 <sup>6</sup>
<b>CuWB50</b>						
MRSA	>500	0	3.3 X 10 <sup>2</sup>	0	0	2 X 10 <sup>6</sup>
ACCB	>500	0	0	0	0	2 X 10 <sup>6</sup>
CD spores	>500	0	0	0	0	3 X 10 <sup>6</sup>
<b>Control UMF</b>						
MRSA	>500	0	2 X 10 <sup>6</sup>	-	-	2 X 10 <sup>6</sup>
ACCB	>500	0	2 X 10 <sup>6</sup>	-	-	2 X 10 <sup>6</sup>
CD spores	>500	0	3 X 10 <sup>5</sup>	-	-	3 X 10 <sup>6</sup>

\* 환경오염원에 대한 체크

\*\* PBS의 무균성 체크

#### 실시예 3

- <115> 도입: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 및 vancomycin-resistant *Enterococci*, 그리고 멸균시키기 매우 어려운 spores of *Clostridium difficile*와 같은 항생제 저항성 박테리아의 병원에서의 출현은 점점 심각한 문제가 되고 있다. 이러한 미생물은 간호사의 유니폼에서 클론화할 수 있고, 이것은 병원에 확산되거나 일반 환경으로 침투하는 방법을 나타내준다.
- <120> 따라서, 본 실시예는 이미 실험실내에서 MRSA, *Acinetobacter* sp., *E. coli* 및 *Clostridium difficile*에 활성을 갖는다고 보이는 CuWB50(여기서 정의된 바와 같이)라고 불리는 copper-based metallo-ion 포뮬레이션이 Ariel™ 생물학적 세정제가 있거나 없는 하나의 모델 세척 시스템(model washing system)에서 활성을 가지는지 여부를 결정하기 위해 수행되었다.
- <121> 약어: C diff, *Clostridium difficile*; MRSA, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; ppm, parts per million;
- <122> 재료 및 방법: 본 연구에서 사용된 MRSA 및 C diff (spores) 미생물들은 임상적 분리주(clinical isolate)이었

다. Stomacher® 400 Circulator는 Seward Ltd (UK)로부터 구입하였다.

**<123>** 1. 여기서 CuWB50으로 불리는 구리 포뮬레이션(copper formulation)의 구체예를 갖거나 갖지 않은 아리얼 세정제(Ariel detergent)를 사용하여 세척하는 프로토콜. 간호사 유니폼의 스와치(swatch)( $100\text{cm}^2$ )를 MRSA 또는 C diff spores로 감염시킨 후 실온에서 3시간동안 건조시켰다. 제조자의 추천 농도로 첨가되고 200ppm의 CuWB50가 들어있거나 들어있지 않은 아리얼 세정제를 포함한 20ml의 물을 포함하는 플라스틱 백에 각각의 스와치를 첨가하였다. 각각의 스와치는 저온 세척 사이클을 시뮬레이트하기 위하여 회전하는 Stomacher안에서 15분간 240rpm의 속도로 프로세스하였다. 세척 후 2ml의 용리액(eluent)을 2ml의 calcium-rich Ringer's solution과 혼합하여 CuWB50을 중화시켰다. 그런 다음, 중화된 용리액(0.1ml)을 블러드 아가 플레이트(blood agar plate)위에 펼친 후, 듀플리케이트 플레이트 위에서 콜로니가 카운트될 때 37°C의 공기중에서 (MRSA) 또는 혐기적으로(C diff spores) 밤새 배양하였다.

**<124>** 2. CuWB50를 포함한 세척 프로토콜을 린스 사이클에 첨가하기. 간호사 유니폼의 스와치( $100\text{cm}^2$ )를 MRSA 또는 C diff spores로 감염시킨 후 실온에서 3시간동안 건조시켰다. 각각의 스와치는 저온 세척 사이클을 모의실험하기 위하여 회전하는 Stomacher안에서 15분간 240rpm의 속도로 처리하였다. 세척 사이클 후에 상기 물은 200ppm의 CuWB50가 들어있는 물로 대체되었고, 다시 Stomacher 안에서 린스 사이클을 시뮬레이트하기 위해 5분간 240rpm의 속도로 프로세스하였다. 2ml의 용리액을 2ml의 calcium-rich Ringer's solution과 혼합하여 CuWB50을 중화시켰다. 중화된 용리액(0.1ml)을 블러드 아가 플레이트(blood agar plate)위에 펼친 후, 듀플리케이트 플레이트 위에서 콜로니가 카운트될 때 37°C에서 공기 중에서 (MRSA) 또는 혐기적으로(C diff spores) 밤새 배양하였다.

**<125>** 결과: 간호사 유니폼 스와치를 아리얼 세정제 단독으로 세척한 경우, 표7에 나타난 것과 같이, 세척 후 MRSA 및 C. diff의 리커버리는 오리지널 이노클럼 레벨(original inoculum level)보다 2-3 로그 정도 감소하였다. 대조적으로 세척이 200ppm의 CuWB50가 들어있는 아리얼로 한 경우에는 6 로그킬(6 log kill)을 수행하였다.

**<126>** 간호사 유니폼 스와치를 물로만 세척한 경우, MRSA 및 C diff의 세척 후 리커버리는 표8에서 보듯이 각 경우마다 단지 1 로그이하 밖에 줄어들지 않았다. 그러나 200ppm의 CuWB50가 들어있는 물에서 5분간 린스한 후에는 남아있는 모든 미생물이 사멸되었고 어떤 콜로니도 관찰되지 않았다.

**<127>** 디스커션: 우리는 CuWB50이 있는 그리고 없는 아리얼 생물학적 세정제로 세척하는 경우 또는 CuWB50를 린스 사이클에 첨가한 경우의 항-세균 효과를 평가하기 위해 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) 또는 *Clostridium difficile* spores (C diff)로 감염된 간호사 유니폼의 스와치를 가지고 모델 세척 시스템을 이용하였다.

**<128>** 그 결과는 아리얼이 박테리아 감염을 2-3 로그정도 줄인 반면, CuWB50는 세척 또는 린스 사이클에 첨가되었을 때 박테리아를 제거/사멸시키는데 100% 효과를 보였다. 본 발명에 따라서 copper-based metallo-ion 포뮬레이션을 병원이나 가정 세탁(laundry)에 첨가할 경우 옷감을 살균하는 경제적이고 효과적인 방법이 될 것이다.

표 7. CuWB50을 함유한 Ariel 세제 또는 함유하지 않은 Ariel 세제를 이용한 세척

균주	초기 접종량	Ariel 세척 후 회복수	CuWB50 함유한 Ariel 세척 후 회복수
MRSA	$2 \times 10^6$	$6.0 \times 10^3$	0
<i>C. difficile</i> 포자	$1 \times 10^6$	$4.2 \times 10^4$	0

표 8. 행굼과정에 첨가된 CuWB50에 의한 세척

균주	초기 접종량	초기 물 세척 후 회복수	CuWB50(200ppm) 행굼 후 회복수
MRSA	$2 \times 10^5$	$8.0 \times 10^4$	0
<i>C. difficile</i> 포자	$1 \times 10^5$	$6.0 \times 10^4$	0

실시예 4

- <134> 도입: 당뇨성 궤양은 치료하기 어려운 심각한 의학적 컨디션을 나타내는데, 특히, 혐기성 또는 항생제 저항성 박테리아에 감염된 경우이다. 당뇨성 족궤양(diabetic foot ulcer)은 종종 속수무책이어서 발가락, 발 그리고 심지어는 다리까지 절단하기에 이른다.
- <135> 당뇨성 궤양의 감염은 일반적으로 하나 이상의 하기의 미생물과 함께 발생한다: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *A calcoaceticus-baumanii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacteroides fragilis*, *Porphyromonas asaccharolytica*, *Finegoldia magna*, *Peptostreptococcus anaerobius* [1-3].
- <136> 본 실시예의 목적은 MRSA, *Acinetobacter sp.t E. coli* and *Clostridium difficile*에 대해 활성을 갖는 것으로 보여졌던 세 개의 copper-based metallo-ion 포뮬레이션, 즉 여기서 명명한 바와 같이, CuAL42, CuPC33 및 CuWB50이 상기 나열된 당뇨성 궤양-관련 미생물에도 마찬가지로 활성을 가지는지 여부를 결정하기 위한 것이다.
- <137> 재료 및 방법: 본 연구에 사용된 미생물들은 임상적 분리주이었다. 표1에 사용된 균주(strain)의 명칭 및 약어 명칭은 하기와 같다: methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *A calcoaceticus-baumanii* (ACCB), *Pseudomonas aeruginosa* (P aerug.), *Klebsiella pneumoniae*, (K pneum.), *Bacteroides fragilis* (B fragilis), *Porphyromonas asaccharolytica* (P asacch), *Finegoldia magna* (F magna), *Peptostreptococcus anaerobius* (P anaerob.).
- <138> MacFarland 0.5 ml 스텠다드 혼탁액은 완충 등장 샐린에서 이들 각각의 미생물로 만들어졌다. 스왑(swab)이 박테리아 혼탁액에 담겨졌고, 그런 다음 아가 플레이트 위에 박테리아 론(lawn of bacteria)을 발생시키기 위하여 블러드 아가 위에 로터리 플레이터를 사용하여 플레이트되었다.
- <139> CuAL42, CuPC33 및 CuWB50의 다양한 농도를 포함한 페이퍼 디스크들(디스크마다 구리는  $\mu\text{g}$ 로 계산됨)이 아가 표면에 놓아지고 상기 플레이트는 37°C에서 24시간동안 Don Whitley Anaerobic Workstation에서 혐기적으로(혐기성 박테리아) 또는 37°C에서 24시간동안 공기 중에서(호기성 박테리아) 배양되었다.
- <140> 억제 구역(Zones of inhibition)은 전자 캘리퍼(electronic calliper)를 이용하여 측정되었고 기록되었다. 표9에서 보이는 결과는 듀플리케이트로 이루어진 테스트로부터 얻은 것이다.
- <141> 결과: 표9 및 도15 및 도16에서 보듯이, 모든 3개의 구리 포뮬레이션은 구리 100  $\mu\text{g}$ 이상의 농도에서 테스트된 8개의 모든 마이크로-미생물들에 대해 일치하여 높은 활성을 보였다.
- <142> 특정 박테리아가 3개의 다른 포뮬레이션에 대해 민감성을 보여 아주 약간의 다양성을 보여주었다. 예를 들면, *cahoaceticus-baumanii*는 50  $\mu\text{g}$ 에서 CuWB50보다 CuAL42 및 CuPC33에 더 민감했고, *K pneumoniae*는 50  $\mu\text{g}$ 에서 오직 CuAL42에만 반응을 보였다.
- <143> MRSA, *S fragilis* 및 *P asaccharolytica*는 최소치의 테스트 농도인 10  $\mu\text{g}$ 에서 3개의 구리 포뮬레이션 모두에 민감하였다.
- <144> 디스커션: 디스크에 구리가 100  $\mu\text{g}$ 이상인 3개의 구리 포뮬레이션 모두의 농도가 8개의 모든 미생물에 대하여 중요한 억제구역을 만들어냈음을 명백하다. 이러한 결과는 영양 세균배양액에서 박테리아를 억제하기 위해 최소한 75  $\mu\text{g}$ 의 구리 포뮬레이션을 필요로 했던 튜브 회석 테스트를 이용한 연구 및 보관된 옷에서 박테리아를 완전히 사멸시키는데 75  $\mu\text{g}$ 의 구리가 들었던 마이크로파이버 섬유 옷을 이용한 연구와 일치하는 것이다. 당뇨병 환자의 감염된 궤양에서 일반적으로 발견되는 호기성 박테리아와 혐기성 박테리아 모두 이러한 디스크 테스트에서 넓은 억제구역에 의해 밝혀진 바와 같이 100  $\mu\text{g}$  이상의 구리 레벨에서 영향받기 쉽다. 다른 구리 포뮬레이션들 및 특정 미생물과의 활성에서 약간의 차이는 있었지만 수가 많지는 않았다.
- <145> 상기 결과는 예시적인 구리 포뮬레이션의 하나 이상을 포함하는 세제, 비누 및 젤 등이 당뇨성 궤양 치료에 유용할 것이라는 것을 말해주며, 이는 당뇨성 궤양의 유지 및 확산을 야기하는 박테리아를 죽이는 그들의 능력이란 면에서, 또한 피부 치료 프로세스를 가속화할 수 있는 능력이란 면에서 그러하다.
- <146> 표 9. 3종류의 구리 금속 이온 화합물로 얻어진 저해대(Zones of Inhibition) 및 당뇨성 궤양과 연관된 8종류의 미생물

Compound	Disc concentration ( $\mu\text{g}$ )	MRS <sup>A</sup>							Diameter of Zones of Inhibition (mm)							
		ACCB	P aerug	K pneum	B fragilis	P asacch	F magna	P anaerob	ACCB	P aerug	K pneum	B fragilis	P asacch	F magna	P anaerob	
CuAl42	10	10.39	0	0	11.3	22.43	0	0	10.39	7.07	8.69	20.98	30.55	15.34	9.81	
	50	10.62	7.95	0	25.17	34.26	18.30	15.35	10.83	8.62	9.38	11.24	26.37	39.11	22.34	
	100	10.83	10.80	0	29.18	42.46	24.16	23.74	11.12	13.47	12.50	15.06	15.55	30.00	17.65	
	200	11.12	12.33	15.51	0	0	0	0	12.33	15.51	15.06	13.55	13.55	12.33	23.74	
	300	12.33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CuPC33	10	9.80	0	0	12.91	18.30	7.2	0	10.00	7.77	7.58	0	18.10	22.29	14.89	
	50	10.00	7.77	0	18.10	22.29	14.89	11.98	10.83	10.05	9.49	7.89	24.89	30.66	19.21	
	100	12.28	10.05	0	25.91	40.96	23.10	15.80	12.28	10.05	9.49	7.89	25.91	40.96	23.10	
	200	13.43	12.05	12.42	0	0	0	0	13.43	12.05	12.42	9.98	13.70	27.28	42.64	
	300	23.61	14.52	13.99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CuWB50	10	13.14	0	0	0	11.35	15.57	0	0	22.69	6.83	0	19.66	20.74	12.72	
	50	22.69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	100	23.59	8.56	7.37	7.71	23.93	29.54	16.76	10.91	23.19	10.37	9.53	8.84	25.88	35.12	25.11
	200	23.19	10.37	11.29	11.05	28.80	39.52	18.65	18.65	25.82	14.21	11.29	11.05	28.80	39.52	22.13
	300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

&lt;147&gt;

실시예 5

&lt;148&gt;

도입: HSG(95)18에서 주어진 것과 같은 권고되는 세탁 시간/온도 관계가 병원 감염(nosocomial infection)에서 특별히 주목받고 있는 미생물에도 효력이 있는지는 현재로선 증거가 거의 없다. 게다가, 이들 세탁조건에 대해 과학적으로 뒷받침된 것도 없다. 결과적으로, 본 실험에는 차가운 세탁 조건(cold wash condition) 하에서 감염된 리넨의 감소에 이르는 조건을 정의하고자 수행된 것이다.

&lt;150&gt;

냉수 세탁 사이클은 항-세균 구리 포뮬레이션의 가장 요구되는 테스트라고 여겨졌다. 게다가, 점차 높아지는 고에너지 요금은 산업 및 가정 세탁에서 보다 낮은 세척 온도의 이용으로 이어질 것 같다 - 만약 충분히 사용하기 간편하고 경제적이고 섬유에 친숙한 항균제품이 개발될 수 있다면 더욱 그러하다.

&lt;151&gt;

본 연구는 마커 마이크로-미생물에 감염된 섬유를 이용하여 세탁의 오염제거에 관한 연구를 기술한다. 테스트 재료는 낮은 온도( $18^{\circ}\text{C}$ )를 이용하는 Electrolux 위성 머신에서 CuWB50라고 불리는 metallo-ion (copper) 포뮬레이션 및 두 개의 상업적으로 가능한 세탁세제( A 및 P로 지정됨)이다.

&lt;152&gt;

약어: ACCB, Acinetobacter sp.; BSA, bovine serum albumin; cfu, Colony forming units; MRS<sup>A</sup>, methicillin-resistant Staphylococcus aureus; PBS, phosphate-buffered saline;

&lt;153&gt;

재료 및 방법: 일반적인 질의 병원 유니폼 섬유의 상업적으로 가능한 스와치(swatch)는 Carrington Career &

Work wear Ltd (UK)에서 제공되었다. 스와치의 조성은 195 g/m<sup>2</sup> 중량인 67%의 폴리에스테르 / 33%의 코튼 블렌드이다.

<154> 새로운 클래리스 컨트롤 시스템(Claris control system)으로 업그레이드된 상업 위생 머신을 Electrolux에서 구입하였다. 클래리스 컨트롤 시스템은 연구자들에게 각각의 세척 사이클의 시간 및 온도를 컨트롤할 수 있는 완전한 융통성을 부여한다. 클래리스 시스템은 또한 각각의 세척 사이클의 내용(specification)을 기록한 전자 데이터 결과를 제공한다. Seward Ltd (UK)로부터 Stomacher<sup>®</sup> 400 Circulator를 구입하였다.

<155> 세탁세제 A 및 P를 지역 슈퍼마켓에서 구입하였다. Bovine serum albumin (BSA)을 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 모든 미생물 시약 및 아가는 Sigma-Aldrich로부터 구입하였다. 모든 미생물 시약 및 아가 플레이트는 Oxoid Ltd (UK)로부터 구입하였다. PBS 및 BSA는 Sigma로부터 구입하였다.

<156> 각각의 스와치는 7% BSA를 포함한 부피 2ml의 PBS안에 methicillin-resistant *Staphylococcus A* (MRSA) 또는 multi-resistant *Acinetobacter* sp. (ACCB)의 임상적 분리주  $2 \times 10^8$ 의 이노클럼으로 감염되었다. 상기 스와치들은 세탁 연구에 이용되기 앞서 실온에서 건조되었다.

<157> 상기 스와치들은 15분의 표준 세탁 시간으로 15리터의 물에 든 보통의 세탁물을 가장하기 위해 차가운 물 세탁 당 5kg의 최종 무게를 만들기 위해 밸ласт 리넨(ballast linen)에 부착되었다. 6개의 세탁 조건들이 두 박테리아 균주로 평가되었다: 1. 물만 사용; 2. 물 + 세제 A; 3. 물 + 세제 P; 4. 물 + CuWB50; 5. 물 + 세제 A + CuWB50; 6. 물 + 세제 P + CuWB50.

<158> 달리 언급이 없다면 CuWB50의 농도는 100ppm이고 세제 A(50 ml) 또는 세제P(25g)의 싱글 젤룰(gelule)이 이용되었다. 각각의 세탁의 마지막에 1 리터의 세탁 후(post-wash) 머신의 물이 모아졌고, 100ml는 원심분리되었고 박테리아 펠렛은 콜로니-포밍 유닛(colony-forming unit, cfu)에 대해 테스트되었다.

<159> 세탁된 감염된 스와치들(n=3), 대조구인 감염되지 않은(깨끗한) 스와치들(n=2; 세탁하는 동안 감염된 스와치로부터의 박테리아의 전이를 평가하기 위함), 그리고 cfu로서 박테리아 감염의 실질적인 척도를 주기 위하여 감염되고 세탁되지 않은 스와치들(오리지널 이노클럼과는 반대임, 따라서 사멸기간동안 미생물의 생존능력의 손실을 컨트롤하기 위함)이 각각 플라스틱 백에 20ml의 PBS와 함께 넣어지고, 실온에서 15분간 Stomacher에서 마시지된다.

<160> 결과물인 Stomacher 박테리아 혼탁액 및 세탁후 머신의 물의 데시밀 회석물이 듀플리케이트 아가 플레이트 위에 놓여지고, cfu의 수가 37°C에서 이후 24시간 배양기간 동안에 카운트되었다.

<161> 결과: 하기의 표의 각각에서 상기의 결과는 (i) 대조구인 감염된 스와치=cfu에서의 초기 박테리아 이노클럼, (ii) 세탁 후(post-wash) 감염된 스와치=세탁후 감염된 스와치에 남아있는 박테리아 cfu, (iii) 세탁 후 머신 용리액=15분 세탁 사이클의 마지막에 세탁 물 안에 있는 프리 박테리아(free bacteria)의 cfu, 및 (iv) 세탁 후 깨끗한 스와치=세탁후 감염되지 않은 스와치에 있는 박테리아 cfu(세탁하는 동안 박테리아 전이를 알려줌)에 대하여 제시되었다.

<162> 표10에서의 결과는 차가운 물 세탁이 감염된 스와치 위의 cfu의 수에서 경미한 감소- ACCB에는 2 로그 감소 및 MRSA에 대해서는 4 로그 감소-를 보였다.

<163> 세탁 후 머신 용리액에서의 ACCB 및 MRSA의 cfu는 양 박테리아에 대해 유사했고, 박테리아 cfu의 깨끗한 스와치로의 전이는 세탁 후에 감염된 스와치 위에 남아있는 cfu 레벨보다 약 2 로그 더 낮았다. 이러한 결과는 차가운 물만의 15분 세탁 사이클이 약간의 박테리아를 감염된 스와치로부터 물 속으로 이동시킬 수 있고, 이를 프리 박테리아 중 몇몇은 세탁 사이클 동안에 깨끗한 스와치 위에 들러붙을 수 있음을 보여준다.

<164> 표11에서의 결과는 어느 세제든 포함한 차가운 물 세탁이 감염된 스와치에서 *Acinetobacter* cfu의 수치에 경미한 감소- 세제 A에 대해서는 2 로그보다 약간 더 큰 감소 및 세제 P에 대해서는 2 로그보다 약간 적은 감소-를 가져옴을 보여준다. 초기 이노클럼이 세제 A가 든 실시예에서 조금 더 높긴 했지만, 세탁 후 머신 용리액에서의 ACCB의 cfu는 세제 P보다 A에 대해 약간 컸다. 박테리아 cfu의 깨끗한 스와치로의 전이는 세탁 후 감염된 스와치 위에 남아있는 cfu의 레벨보다 약 2 로그 더 낮았다. 이러한 결과는 차가운 물 및 세제의 15분 세탁 사이클이 약간의 *Acinetobacter*를 감염된 스와치로부터 물 속으로 이동시킬 수 있고, 이러한 프리 박테리아 중 몇몇은 세탁 사이클 동안에 깨끗한 스와치 위에 들러붙을 수 있음을 보여준다. 그러나, 상기 결과는 이들 세제가 *Acinetobacter*에 대한 박테리아 활성을 거의 갖지 않음으로 인해 물만으로 실험한 표10에서의 결과와 그다지 다

르지 않음을 보여준다.

- <165> 표12에서의 결과는 두 개의 세제 모두를 가진 차가운 물 세탁이 감염된 스와치 위의 MRSA cfu의 수치에서 5 내지 6 로그의 실질적인 감소를 나타냄을 보여주고, 이는 두 개의 세제를 쓰면 MRSA에 대해 강한 항-박테리아 효과가 있음을 의미한다. 세탁 후 머신 용리액 및 깨끗한 스와치로 전이한 MRSA의 cfu의 레벨은 매우 낮아 상기 세제들이 MRSA에 대해 강한 항-박테리아 효과를 가진다는 것을 뒷받침한다. 이러한 결과는 양 세제들이 Acinetobacter에서는 보이지 않았던(표11) MRSA에 대한 강한 항-박테리아 효과를 가짐을 지시한다.
- <166> 표13에서의 결과는 CuWB50만을 포함한 차가운 물 세탁은 넓은 농도 범위에 걸쳐 박테리아 감염을 줄이는데 매우 효과적임을 보여준다. Acinetobacter는 CuWB50에 더욱 민감하고, 농도 100 및 15 ppm의 농도에서는 완전하게 사멸된다. 1 내지 10 ppm의 농도에서의 CuWB50에서는, Acinetobacter cfu의 3 내지 5 로그 감소라는 상당한 항-박테리아 효과를 보여준다. 거의 모든 CuWB50 농도에서, Acinetobacter는 머신 용리액에서 살아남지 못하거나 깨끗한 스와치로 전이되지 못했다. CuWB50은 또한 MRSA에 대해서도 1 내지 100ppm의 농도에서 4 내지 5 로그 킬을 보임으로써 효과적임을 나타냈다. Acinetobacter에서와 같이, 아주 적은 MRSA cfu는 CuWB50의 어느 농도에서든 머신 용리액 안에서나 깨끗한 스와치안에서 탐지되었다. 이러한 결과는 Acinetobacter가 다소 MRSA보다 더 민감하긴 하지만 양 박테리아 균주는 모두 CuWB50에 매우 민감하다는 것을 보여준다.
- <167> 표14에서의 결과는 세제 A나 P 중 하나의 세제와 결합한 CuWB50의 100ppm은 어느 세탁 후 샘플에서도 cfu가 탐지되지 않아 Acinetobacter 및 MRSA를 모두 사멸시킨다는 것을 명백하게 보여준다. 표13에서의 결과가 CuWB50 100ppm은 상기 결과를 설명하듯이 Acinetobacter를 완전하게 사멸시킴을 보여주는 반면에, 표11에서의 결과는 어느 세제든 하나의 세제 단독만으로는 Acinetobacter(2 로그 킬)에 거의 영향이 없음을 보여준다.
- <168> 표12에서의 결과는 양 세제만으로도 MRSA에 대해 5 로그 킬을 보여줌으로써 상당히 효과적임을 보여주며, 표13에서의 결과는 CuWB50가 MRSA에 대해서도 매우 효과적임(5 로그 킬)을 보여준다. 따라서, 상기의 결과들은 CuWB50을 포함한 세제가 MRSA까지도 완전하게 사멸하는 부가적 효과(additive effect)까지 제시한다.
- <169> 표15에서의 결과는 세제 A와 결합된 100ppm에서의 CuWB50이 차가운 물 조건 하에서 Acinetobacter 및 MRSA 둘다를 완전하게 사멸시킴을 보여줌으로써 표14에서의 결과들을 확인시켜준다. 뿐만 아니라, 표15에서의 결과는 세제 A 및 5ppm의 낮은 농도에서의 CuWB50라도 양 박테리아를 죽이는 데는 매우 효과적임을 보여준다. MRSA는 또한 2ppm의 CuWB50을 가진 세제 A에 의해 완전히 사멸되고, 반면에 Acinetobacter는 단지 2 로그 킬을 보임으로써 이 농도에서는 덜 민감함을 보여준다. 이러한 결과는 세제 A와 결합된 5ppm 이상의 농도에서의 CuWB50은 심지어 더 낮은 세탁 온도에서 사용되어도 잡재적인 항-박테리아 조합을 형성하리라는 것을 보여준다.
- <170> 디스커션: 간호사의 유니폼 직물의 MRSA- 또는 Acinetobacter-감염된 스와치를 2개의 상업 세탁 세제와 함께 또는 넣지 않고 한 차가운 물 세탁에 있어서, 살균성 구리 화합물인, CuWB50의 상기 효과는 산업용 Electrolux 워싱 머신을 이용하여 평가되었다. 차가운 물만으로 세탁하는 것은 감염된 스와치 위에 있는 MRSA 및 ACCB cfu에서 2-3 로그 감소를 보였지만(표10), 방출된 박테리아는 세탁 후 용리액이나 무균 스와치에서 탐지되었다.
- <171> 두 개의 상업 세제만 이용된 경우는 감염된 스와치로부터 ACCB (cfu에서 1-2 로그 감소; 표11)를 제거하는 것보다 MRSA를 제거함(cfu에서 5-6 로그 감소; 표12)에 더욱 효과적이었다. 양 경우에, 살아있는 박테리아는 머신 세탁후 용리액 및 무균 스와치에서 탐지되었지만, 리커버된(recovered) 박테리아 수는 MRSA의 경우에 줄어들었으며, 이는 이 박테리아 균주에 대해서는 세제의 항-박테리아 효과가 경미함을 보여준다.
- <172> 표13에서 보듯이, CuWB50만으로 100 및 15ppm에서 ACCB를 완전히 사멸시키고, 1ppm과 같이 낮은 농도에서도 3-4 로그로 cfu를 줄인다. 1-100ppm의 CuWB50만으로도 MRSA cfu를 4-5 로그로 줄인다. 양 경우에, 머신 세탁 후 용리액 및 무균 스와치에서 리커버된 박테리아의 수는 실질적으로 줄어들었고, 이는 차가운 물 세탁에서 심지어 낮은 농도에서 CuWB50 단독의 항-박테리아 효과를 보여준다.
- <173> 두 개의 세제중 어느 하나와 결합한 100ppm의 CuWB50은 감염된 스와치, 머신 세탁 후 용리액 및 무균 스와치에서의 ACCB 및 MRSA 모두를 100% 사멸시킨 것으로 나타났다(표14). 100ppm의 CuWB50가 단독으로는 MRSA에 대해 완전하게 효과적이지 않았고(표13) 양 세제는 MRSA를 죽이는 그들의 능력에 대해 약간의 다양성을 보였기 때문에(표12), 두 개의 산물을 함께 사용할 경우 완전한 오염제거에 이를 수 있는 부가적인 효과가 있음이 명백하다. ACCB는 두 개의 세제 단독에 대해 상대적으로 저항적이었지만(표11), CuWB50에 대해서는 매우 민감했고(표13), CuWB50과 두 개의 세제 중 어느 하나와의 조합은 ACCB의 완전한 사멸을 가져왔다.
- <174> 사실, CuWB50와 세제 A의 조합은 MRSA에 대하여 CuWB50의 모든 농도에서(2-100ppm)에서, 그리고 ACCB에 대하여 CuWB50의 5-100ppm의 농도에서 매우 효과적이었다. 모든 경우에, 어떤 살아있는 박테리아도 머신 세탁 후 용리액

액이나 무균 스와치에서 리커버되지 못했다.

&lt;175&gt;

결론적으로, 이러한 결과는 간호사의 유니폼을 세제만 가지고 차가운 물 세탁을 하는 것은 모든 박테리아 감염을 제거하는데에 그리 효과적이지 않음을 제시한다. 둘 중 어느 세제와 함께 아주 작은 5-10ppm의 CuWB50이라도 추가하여 차가운 물 세탁을 하면 MRSA- 및 ACCB-감염된 스와치 및 머신 세탁 후 용리액 및 무균 스와치의 완전한 살균을 가져왔다. 단지 5ml의 제형된 조성물 스타크용액(formulated composition stock solution)을 첨가함으로써 10ppm 농도의 CuWB50가 만들어졌고 이를 실험에 사용된 스와치에 박테리아 감염 레벨이 높은 것(약  $10^8$  cfu)을 감안한다면, 상기 결과는 머신 세탁에 보통의 상업적 세탁 세제와 함께 CuWB50의 추가하면 모든 병원 세탁물에서 박테리아 감염을 상당히 줄이는데 도움이 될 수 있음을 제시한다. 비록 C. difficile spore는 테스트되지 않았지만, 여기 제시된 결과는 C. difficile spore도 CuWB50/세제 조합에 의해 효과적으로 감염을 막을 수 있음을 보여준다.

&lt;176&gt;

표 10. 오염된 견본 조각에서 *Acinobacter*(ACCB) 및 MRSA를 제거하는 데에 있어 찬물만으로 세척했을 때의 효과

	Contaminated swatches cfu	Post-wash contaminated swatches cfu	Machine post-wash eluent cfu	Post-wash clean swatches cfu
<b>ACCB</b>				
Expt 1	$1.2 \times 10^8$	$6.0 \times 10^5$ ; $1.6 \times 10^5$ ; $3.0 \times 10^4$	$4.9 \times 10^3$	$8.0 \times 10^2$ ; 0
Expt 2	$7.2 \times 10^6$	$1.2 \times 10^5$ ; $7.4 \times 10^4$ ; $6.0 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$	$3.8 \times 10^3$ ; $2.8 \times 10^3$
Expt 3	$1.2 \times 10^7$	$1.0 \times 10^5$ ; $4.2 \times 10^4$ ; $4.5 \times 10^4$	0	NT; NT
Average	$4.6 \times 10^7$	$1.4 \times 10^5$	$6.6 \times 10^3$	$1.9 \times 10^3$
<b>MRSA</b>				
Expt 1	$9.0 \times 10^7$	$1.4 \times 10^4$ ; $1.0 \times 10^5$ ; $9.2 \times 10^5$	$2.4 \times 10^3$	$6.0 \times 10^2$ ; $8.0 \times 10^2$
Expt 2	$2.6 \times 10^8$	$2.4 \times 10^3$ ; $3.6 \times 10^3$ ; $2.4 \times 10^3$	$8.2 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$ ; $1.0 \times 10^3$
Expt 3	$2.5 \times 10^8$	$1.9 \times 10^3$ ; $2.4 \times 10^4$ ; $1.6 \times 10^4$	0	NT; NT
Average	$2 \times 10^8$	$1.5 \times 10^5$	$3.5 \times 10^3$	$9 \times 10^2$

&lt;177&gt;

표 11. 오염된 견본 조각에서 *Acinobacter*를 제거하는 데에 있어 세제A 또는 세제P를 사용하여 찬물 세척했을 때의 효과

	Contaminated swatches cfu	Post-wash contaminated swatches cfu	Machine post-wash eluent cfu	Post-wash clean swatches cfu
<b>Detergent A</b>				
Expt 1	$1.1 \times 10^7$	$1.6 \times 10^5$ ; $2.3 \times 10^5$ ; $1.7 \times 10^5$	$5.9 \times 10^4$	$2.0 \times 10^3$ ; $1.6 \times 10^3$
Expt 2	$2.1 \times 10^8$	$3.8 \times 10^5$ ; $2.4 \times 10^5$ ; $4.8 \times 10^5$	$2.8 \times 10^4$	$3.6 \times 10^3$ ; $2.8 \times 10^3$
Expt 3	$5.8 \times 10^6$	$1.0 \times 10^5$ ; $1.1 \times 10^5$ ; $9.8 \times 10^4$	$5.8 \times 10^1$	0; 0
Average	$7.6 \times 10^7$	$2.2 \times 10^5$	$2.9 \times 10^4$	$1.7 \times 10^3$
<b>Detergent P</b>				
Expt 1	$6.6 \times 10^6$	$2.1 \times 10^5$ ; $1.6 \times 10^4$ ; $2.1 \times 10^5$	$7.4 \times 10^2$	$1.2 \times 10^3$ ; $1.6 \times 10^3$
Expt 2	$1.9 \times 10^7$	$4.0 \times 10^5$ ; $3.4 \times 10^5$ ; $3.6 \times 10^5$	$1.3 \times 10^3$	$3.0 \times 10^3$ ; $1.6 \times 10^3$
Expt 3	$2.6 \times 10^6$	$1.8 \times 10^4$ ; $2.8 \times 10^4$ ; $3.8 \times 10^4$	$5.4 \times 10^2$	$6.0 \times 10^2$ ; $5.0 \times 10^2$
Average	$9.4 \times 10^6$	$1.8 \times 10^5$	$8.6 \times 10^2$	$1.4 \times 10^3$

&lt;179&gt;

표 12. 오염된 견본 조각에서 MRSA를 제거하는 데에 있어 세제A 또는 세제P를 사용하여 찬물 세척했을 때의 효과

	Contaminated swatches cfu	Post-wash contaminated swatches cfu	Machine post-wash eluent cfu	Post-wash clean swatches cfu
<b>Detergent A</b>				
Expt 1	$1.9 \times 10^8$	$1.2 \times 10^3$ ; $8.0 \times 10^2$ ; $1.0 \times 10^3$	$1.2 \times 10^3$	$0$ ; $2.0 \times 10^2$
Expt 2	$8.0 \times 10^7$	$2.0 \times 10^3$ ; $3.2 \times 10^3$ ; $2.6 \times 10^3$	$2.4 \times 10^3$	$0$ ; $0$
Expt 3	$1.0 \times 10^7$	$0$ ; $0$ ; $0$	$0$	$0$ ; $0$
Expt 4	$9.8 \times 10^6$	$0$ ; $0$ ; $0$	$0$	$0$ ; $0$
Expt 5	$7.4 \times 10^7$	$0$ ; $0$ ; $0$	$0$	$0$ ; $0$
<b>Average</b>	$7.3 \times 10^7$	$7.2 \times 10^2$	$7.2 \times 10^2$	$2.0 \times 10^1$
<b>Detergent P</b>				
Expt 1	$1.3 \times 10^8$	$0$ ; $0$ ; $0$	$1.5 \times 10^2$	$0$ ; $0$
Expt 2	$2.9 \times 10^7$	$8.0 \times 10^2$ ; $8.0 \times 10^2$ ; $4.0 \times 10^2$	$1.0 \times 10^1$	$1.0 \times 10^3$ ; $1.2 \times 10^3$
Expt 3	$8.8 \times 10^7$	$0$ ; $0$ ; $0$	$0$	$0$ ; $0$
Expt 4	$2.0 \times 10^8$	$0$ ; $0$ ; $0$	$0$	$0$ ; $0$
Expt 5	$2.0 \times 10^8$	$0$ ; $0$ ; $0$	$0$	$0$ ; $0$
<b>Average</b>	$1.3 \times 10^8$	$1.3 \times 10^2$	$3.2 \times 10^1$	$2.2 \times 10^2$

&lt;181&gt;

&lt;182&gt;

표 13. 오염된 견본 조각에서 *Acinetobacter*(ACCB) 및 MRSA를 제거하는 데에 있어 항박테리아 구리 화합물 CuWB50을 사용하여 치료 세척했을 때의 효과

CuWB50 (ppm)	Contaminated swatches cfu	Post-wash contaminated swatches cfu	Machine post-wash eluent cfu	Post-wash clean swatches cfu
<b>ACCB</b>				
100 (n = 5)*	$4.8 \times 10^7$	$0$	$0$	$0$
15 (n = 2)	$1.5 \times 10^7$	$0$	$0$	$0$
10 (n = 1)	$4.1 \times 10^7$	$9.3 \times 10^2$	$0$	$0$
5 (n = 2)	$4.5 \times 10^7$	$1.4 \times 10^3$	$1.0 \times 10^1$	$0$
1 (n = 1)	$8.8 \times 10^6$	$1.5 \times 10^3$	$0$	$0$
<b>MRSA</b>				
100 (n = 5)	$1.9 \times 10^8$	$1.9 \times 10^3$	$6.2 \times 10^0$	$0$
15 (n = 2)	$1.6 \times 10^6$	$1.8 \times 10^2$	$0$	$0$
10 (n = 1)	$2.5 \times 10^8$	$3.0 \times 10^3$	$2.0 \times 10^2$	$0$
5 (n = 2)	$8.7 \times 10^7$	$6.7 \times 10^3$	$2.1 \times 10^3$	$0$
1 (n = 1)	$2.1 \times 10^7$	$9.3 \times 10^2$	$0$	$0$

&lt;183&gt;

&lt;184&gt;

표 14. 오염된 견본 조각에서 *Acinetobacter*(ACCB) 및 MRSA를 제거하는 데에 있어 CuWB50 (100ppm) 및 2종류의 세제(A와 P)를 함께 사용하여 치료 세척했을 때의 효과

CuWB50 100 ppm plus...	Contaminated swatches cfu	Post-wash contaminated swatches cfu	Machine post-wash eluent cfu	Post-wash clean swatches cfu
<b>ACCB</b>				
Detergent A*	$8.2 \times 10^6$	$0$	$0$	$0$
Detergent P	$1.2 \times 10^7$	$0$	$0$	$0$
<b>MRSA</b>				
Detergent A	$3.9 \times 10^5$	$0$	$0$	$0$
Detergent P	$1.2 \times 10^7$	$0$	$0$	$0$

&lt;185&gt;

&lt;186&gt;

표 15. 오염된 견본 조각에서 *Acinetobacter*(ACCB) 및 MRSA를 제거하는 데에 있어 여러 농도의 CuWB50 및 세제 A를 함께 사용하여 치료 세척했을 때의 효과

CuWB50 (ppm)	Contaminated swatches cfu	Post-wash contaminated swatches cfu	Machine post- wash eluent cfu	Post-wash clean swatches cfu
<b>ACCB</b>				
50 (n = 2)*	$1.3 \times 10^7$	0	0	0
25 (n = 1)	$1.3 \times 10^7$	0	0	0
10 (n = 1)	$1.2 \times 10^7$	0	0	0
5 (n = 1)	$9.0 \times 10^6$	0	0	0
2 (n = 2)	$4.6 \times 10^6$	$2.2 \times 10^4$	0	0
<b>MRSA</b>				
100 (n = 5)	$6.2 \times 10^7$	0	0	0
25 (n = 1)	$6.4 \times 10^7$	0	0	0
10 (n = 1)	$1.4 \times 10^8$	0	0	0
5 (n = 1)	$3.6 \times 10^7$	0	0	0
2 (n = 2)	$2.2 \times 10^7$	0	0	0

&lt;187&gt;

&lt;188&gt;

실시예 7

&lt;189&gt;

**도입:** 병원위생에서 중요한 고려사항은 손의 청결도이다. Purell™ (Gojo Industries Inc, USA)은 영국의 병원에서 간호사들에 의해 현재 널리 사용되고 있는 알코올-베이스의 핸드 젤(hand gel)이다. 구리 메탈로-이온 합성물 CuAL42는 5 가지의 일반적인 병원성 균주들에 대한 강한 항균 효과를 가지는 것으로 보여져 왔다. 결과적으로, Xgel이라 불리는 CuAL42 314 ppm을 포함하는 Aloe vera에 기초한 알코올을 포함하지 않는 핸드 젤이 제제(formulated)되어 본 예에서 Purell과 비교되어 왔다. 사용된 프로토콜은 EN(European Norm) 12054 (1997)으로, 테스트 중인 제품이 요구되는 표준을 달성하기 위해서 60초 동안에 4 Log kill을 생산해야만 한다.

&lt;190&gt;

**약어:** ACCB, Acinetobacter sp.; BSA, bovine serum albumin; cfu, Colony forming units; MRSA, methicillin-resistant Staphylococcus aureus; PBS, phosphate-buffered saline;

&lt;191&gt;

**결과:** 도 5-7에서와 같이, MRSA 및 ACCB의 각각의 경우에, Purell™ 및 Xgel은 모두 60초 동안에 요구되는 4 Log kill을 달성했다. 하지만, 두 경우 모두에 있어서, Xgel은, Xgel이 두 균주 모두를 100% 살균시킨다는 점에서 Purell에 비해서 상당히 더 효과적이었다. C. difficile spores의 경우에, Purell이 비효과적인데 반해, Xgel은 60초 동안에 요구되는 4 Log kill을 거의 달성했다(3000-fold kill).

&lt;192&gt;

**재료 및 방법:** 표준 EN 12054 (1997) 프로토콜이 뒤따른다. 간략히, 9ml의 테스트 핸드 젤이 1ml의 박테리아 액(bacterial suspension)에 섞여 혼합된다. 30초와 60초에서 1ml의 알리퀴트(aliquots)를 취해 5분 동안 9ml의 링거액과 혼합된다. 다음으로, 알리퀴트가 취해져 아가 플레이트(agar plate)로 확산하고, CFU가 카운트될 때 밤새도록 배양된다(incubated).

&lt;193&gt;

**토론:** 손의 청결도는 병원 위생에 있어서 매우 중요한데, 이는 박테리아 또는 그들의 포자(spores)가 손의 접촉에 의해서 쉽게 병원 주위에 확산될 수 있기 때문이다. Purell™은 영국의 병원의 근로자들에 의해서 현재 널리 사용되고 있는 알코올-베이스의 핸드 젤이다.

&lt;194&gt;

본 연구 결과는 314 ppm CuAL42를 포함하는 Aloe vera-베이스의 핸드 젤인 Xgel이 Purell™보다 3 가지 중요한 병원성 박테리아인 MRSA, Acinetobacter sp. and C. difficile spores에 대해 상당히 더 효과적이다. 이러한 측면에서, C. difficile이 MRSA보다 환자의 건강에 더욱 위협이 되며, 많은 환자들이 MRSA보다 C. difficile로부터 죽어간다는 것에 주목할 필요가 있다.

&lt;195&gt;

알코올-베이스 핸드 젤과 같은, Purell™은 오랫동안 반복적으로 사용할 경우 피부 건조 및 갈라짐을 야기한다고 알려져 있다. 대조적으로, 알코올을 포함하지 않고 Aloe vera 베이스을 가지는 Xgel이 손에 매우 유익하다. 더욱이, 우리의 예비 연구에 의하면, 알코올이 증발할 때 남는 Purell의 잔여물이 여전히 MRSA나 Acinetobacter sp.의 성장을 적어도 3시간 동안 지원할 수 있는 반면에, Xgel의 잔여물은 박테리아의 생존을 전혀 허락하지 않는다.

&lt;196&gt;

실시예 8

&lt;197&gt;

구리 합성물이 코팅된 CuAL42, CuPC33 및 CuWB50, 그들의 콤포넌트 바인더(component binders) 및 황산구리

(copper sulphate)용액에 대한 MRSA 및 Acinetobacter sp (ACCB) 시간 사멸곡선(kill-curve)에 대한 레포트.

#### <198> 도입

우리는 저 농도 이들 구리 합성물(CuAL42, CuPC33 및 CuWB50)의 1ppm은 두 시간 동안에 걸쳐 3-4 log kill을 달성했다는 것을 보여 주었다(도 17 내지 도19 참조). 우리는 RPMI-1460 매체를 사용하는 MIC/MBC 투브 방법에 의해서 결정되는 최소 살균 농도(minimal bactericidal concentration, MBC) 및 실험적인 환경 청결 상태에서 사용되는 150ppm 상태에서 다양한 time kill 실험을 수행하였다.

#### <200> MIC/MBC 결정

<201> 각각의 화합물, 관련 바인더 및 황산구리(sulphate)에 대한 MIC/MBC는 각각의 최종 농도를 RPMI-1460 매체(Sigma)에서 100ppm에서 1ppm에 이르도록 한 후 투브 당 접종원  $2 \times 10^5$  박테리아가 뿐려진다. 모든 투브는 37°C에서 밤새 배양되며, 1ppm으로부터 위쪽으로 읽혀지는 어떠한 성장도 나타내지 않는 제1 투브로서 MIC가 취해진다. MBC는 블러드 아가(blood agar)에 대해 아무런 성장을 보이지 않는 모든 투브를 계대배양(subculturing)하고, 37°C에서 밤새 배양하여 서바이빙 콜로니(surviving colonies)의 성장을 읽어 들인다. MBC는 (가장 낮은 농도로부터 위쪽으로 읽는) 아가 플레이트에 대한 어떠한 성장도 보이지 않는 제1 투브로서 취해진다.

#### <202> 타임 킬 커브(Time Kill curves)

<203> Time kill curves RPMI-1460 매체(Sigma)를 사용하여 수행된다.

<204> MRSA는 20ppm 및 150ppm의 각각의 합성물, 바인더 및 황산구리(도 1-2참조)에서 테스트된다. ACCB는 40ppm 및 150ppm의 각각의 합성물, 바인더, 황산구리(도 3-4참조)에서 테스트된다. 각각의 실험에 대한 성장 대조구(growth control)는 RPMI-1460과 테스트 미생물(organism)으로만 구성된다.

<205> 각각의 반응 투브는 요구되는 농도의 합성물, 바인더 또는 황산구리를 포함하는 10ml의 RPMI-1460으로 구성되며,  $2 \times 10^6$ 의 미생물(organisms)이 뿐려진 후 37°C에서 즉각적으로 배양된다. 알리쿼트(Aliquots)는 0, 15, 30, 60, 120, 360 및 960분 지점에서 취해지며, 희석액으로서 쿼터 농도(quarter strength)의 링거액을 사용하여 생균수 측정(viable count)이 세 번씩 행해진다. 콜로니(colonies)가 카운트되며, 생존수는 유닛(unit s)을 형성하는 콜로니로서 표현된다. 콜로니 카운트의 기록(log)은 각각의 화합물, 바인더 및 황산구리에 대한 각각의 농도에서 각각의 미생물에 대한 TK 커브를 산출하기 위해 각각의 시점에 대해서 계획(plotted)된다. 성장 대조구 커브가 성장률의 비교를 위해서 각각의 커브 시리즈에서 계획된다. 바인더라는 용어는 여기에서는 구리 화합물(compound) 자체와는 별도로 구리 컴파지션(composition)에서 존재하는 콤포넌트를 포함하도록 구어적으로 사용된다.

#### <206> 결과 요약

<207> MRSA에 대한 MIC/MBC 결정의 결과는 10/20ppm이다.

<208> ACCB에 대한 MIC/MBC 결정의 결과는 20/40ppm이다.

#### <209> Time Kill 커브

<210> MRSA에 대하여: 20ppm의 CuAL42 및 CuWB50에서 6시간 내에 4 log kill을 달성하고, 6 시간과 16시간 사이에서 6 log kill를 달성한다. CuPC33에 대한 log kill은 각각 3 log와 6 log이다. 150ppm의 CuAL42 및 CuWB50에서 60분후에 6 log kill이 달성되며, CuPC33는 120분후에 달성된다. 모든 바인더 및 황산구리가 일부 활동성을 가지지만, 박테리아가 회복된다.

<211> ACCB에 대한 경우: 40ppm에서 세 개의 조성물은 6시간 후에 4 로그 킬(log kill)을, 6 내지 16시간 사이에 6 로그 킬을 보였다. 150ppm에서 모든 세 개의 조성물은 60분 후에 6 로그 킬을 성취하였다. 모든 결합제(binders) 및 황산동(copper sulphate)은 초기 활성(little initial activity)을 거의 보이지 않았지만 박테리아는 리커버되었다.

<212> 첨부된 도1 내지 4는 0, 15, 30, 60, 120, 360분 및 최종 960분(26시간 배양(incubation))후에 대해 기록된 각 조합(combination)에 대한 성장 곡선을 보여준다.

#### <213> 실시예 9

<214> 구리 기체 살생물제(cooper-based biocides)를 함유한 무알콜 핸드 젤(non-alcoholic hand gel)의 오염 제거

## 효능

<215> 핸드 젤 용도(purpose-made)의 적용(application)에 의한 손 오염제거는 감염 억제에 필수적이다. 현재 대부분의 핸드 젤은 살균성과 신속한 건조 특성을 제공하는 이소프로필 알콜을 함유한다. 알콜은 손과 환경에 이롭지도 않고 혈류에 흡수된다. 우리는 3개가, 314ppm과 같은 300ppm 영역의 활성동(effective copper)을 함유하는 3개의 무기 살생물제 (CuWB50, CuAL42, 및 CuPC33) 중 하나를 포함하는 4개의 무알콜 알로에 베라 핸드 젤을 제형하고하고(formulated), 이들이 상업적 제조물(commercial preparation)로서 효과적으로 손을 오염 제거할 수 있는지 여부를 조사했다. 지원자들의 손에  $10^6$  CFU 또는 MRSA, 또는 E coli를 묻힌 직후 손바닥/손가락 자국을 찍었다. 그 후 4개의 핸드 젤 중 하나를 손에 문지르고 시간 간격을 두고 다음 자국을 찍었다. 알로에 베라 대조구(control)와 달리, 적용 직후 및 이후 모든 시간에서 CuAL42 또는 CuWB50 함유 젤로부터 MRSA가 재검출되지 않았다. MRSA는 CuPC33을 처리한 손에서 15분 동안 재검출되었다. 상기 대조구와 달리, E coli는 CuAL42를 함유한 젤로 처리된 손에서 어떤 시간점(time point)에서도 재검출되지 않았다; 나머지 2개의 젤에 대해서 미생물(organism)의 완전한 사멸은 오직 그 이후 시간점에서 보여졌다. 우리는 CuAL42 함유 젤이 손에서 생존 가능한 미생물을 신속하고 효과적으로 박멸하고, 보다 개별적으로 그리고 생태학적으로 만족스러운 대안을 제공할 수 있다는 결론을 얻었다. 결과는 도 5, 6 및 7에 도시되어 있다.

## 실시예 10

### CuAL42, CuPC33 및 CuWB50의 안정성: 배양된 조직 내 살아있는 인간 세포에서의 세포독성 효과에 대한 고찰

#### 배경, 목표 및 목적물

여기에서 다른 실시예들은 이들 조성물이 개별 성분에 비해 예상외로 뛰어난 항박테리아 활성(antibacterial activity)을 보임에 주목하였다. 이번 실시예는 박테리아 병원체들에 대한 항박테리아 및 유독 특성 CuWB50, CuPC33 및 CuAL42가 포유류(인간) 세포에까지 영향을 미치는지 여부를 조사하기 위해 준비된다.

#### 재료 및 방법

<221> 상기 3개의 구리 함유 항균제(antimicrobial solution) CuPC33, CuAL42 및 CuWB50이 제공되고 각각 구리 이온 30.43 g/L씩을 함유한다. 황산동의 대조구 용액은 종류수의 농도와 같은 농도로 만들어졌다. 두 개의 인간 세포 라인(cell lines)가 이 실시예를 위해 사용되었다: HT-29, 장상피 세포 라인(intestinal epithelial cell line), 및 U937, 단핵구성 림프종(monocytic lymphoma). 적절하고 완벽한 배지(media) 내 다양한 농도의 황산동 또는 상기 구리 함유 항균 용액(antibiotic solution)의 샘플들이 확립된(established) 세포 배양에 추가되고, 상기 세포들은 24 또는 48 시간동안 더 배양된다. 현미경 검사 후에 상기 세포들은 고정되고(fix) sulforhodamine (SRB) cytotoxicity assay를 사용한 세포파괴를 양적으로 결정하기 염색되고, 국립암센터(National Cancer Institute)에서 현상되고(developed) 확인되었다.

<222> CuPC33(■), CuAL42(▲), CuWB50(▼) 및 황산동(◆)의 세포파괴 퍼센트는 5% 또는 25% fetal calf serum (FCS) 함유 배지 내 24 및 48시간 시간점에서 HT-29 세포들을 사용하여 측정되었다. 모든 테스트 배양은 3번 수행되었다. 결과는 도8에 도시되어 있다.

<223> CuPC33(■), CuAL42(▲), CuWB50(▼) 및 황산동(◆)의 세포파괴 퍼센트는 5% 또는 25% fetal calf serum (FCS) 함유 배지 내 24 및 48시간 시간점에서 U937 세포들을 사용하여 측정되었다. 모든 테스트 배양은 3번 수행되었다. 결과는 도9에 도시되어 있다.

#### 결과

<225> 현미경에 의한 검사결과 5% 또는 25% FCS를 가진 둘 중의 하나의 세포 라인에서 1-100ppm 농도의 항박테리아 용액 또는 황산동을 함유하는 copper-metalloc-ion의 명백한 유독 효과는 없었다. 그러나 5% FCS를 갖는 배지 내 HT-29 세포들은 세포 사멸의 명백한 사인(과립모양 사이토플라즘을 가진 라운딩 업 및 굴절성의 손상)을 보이는 반면, 1000ppm에서 구리 함유 항균 용액 및 황산동은 25% FCS를 갖는 배지 내에서 HT-29 세포들의 라운딩 업(rounding up)을 야기하였다. 이러한 효과는 24 및 48 시간 배양에서 유사했다. HT-29는 5% 또는 25% FCS를 가진 배지에서 동등하게 되었다(도8의 설명(legend)에서 대조구(control) 광학밀도 값과 구리 함유 항균 용액의 세포파괴 효과에 대응하는 보호의 결과로 세럼의 농도가 증가함을 보라). U937 세포는 5% FCS의 배지 보다 25% FCS 배지에서 더 잘 배양되었으나(도9의 설명(legend)에서 대조구 광학밀도를 보라) HT-29와 같이 구리 함유 항생물제 및 황산동의 세포파괴의 유사한 패턴을 보여준다.

<226> 상기 SPB assay 결과들은 100ppm까지의 농도에서 상기 3개의 copper-metallo-ion 함유 항박테리아 용액 어느 것 또는 황산동에 의해 HT-29 세포들(도8) 또는 U927 세포들(도9)의 현저한 세포파괴가 없었음을 확인한다. 1000ppm에서 양 세포 라인의 24 및 48시간 배양에서 모든 3개 구리 함유 항박테리아 용액에 의해 일반적으로 80-100% 세포파괴가 있었다. 증가된 세럼 농도의 경미한 보호 효과는 SRB assay에 의해 구별될 수 없고 세포들의 현미경 평가(evaluation) 값을 강조한다. 황산동은 25% FCS를 함유하는 배지 내에서 HT-29 및 U937에 대해 훨씬 덜 유독하였다(도8 및 도9, 패널 C 및 D).

## <227> 결론

<228> 상기 3개의 구리 함유 항생물제 CuPC, CuAL42 및 CuWB50 및 황산동은 1 내지 100ppm의 농도에서 2개의 다른 인간 세포 라인에 대해 상당히 세포독성(cytotoxic)이지 않았다. 1000ppm에서 모든 3개의 구리 함유 항생물제는 양쪽 인간 세포 라인에 대해 매우 세포독성이었고, 이 결과는 배지 내 더 높은 FCS 레벨에 의해 오직 적당히 감소되었다. 세럼 농도의 증가에 의해 실질적으로 감소되기는 하였으나 1000ppm에서 황산동 또한 양쪽 인간 세포 라인에 대해 매우 유독하였고 SRB assay에 의해 시각화될 수 있었다.

<229> 상기 결과는 모든 세가지 구리 composition의 유독성의 매우 큰 생물학적 안전 창(window)이 포유류(인간) 세포보다는 박테리아에 그들 효과가 중요하게 존재한다는 것을 시사한다. 이러한 결론은 인간 세포 라인에 대해 무세포독성이 검출될 수 있는 농도인 1-100ppm의 농도 범위에서 상기 composition의 명확한 항균 효과에 기초한다.

## <230> 실시예 11

<231> 오염된 클리닝 천(cleaning cloths)에 존재하는 박테리아 바이오버든(bioburden)을 감소 또는 제거하기 위한 CuAL42, CuWB50, 및 CuPC33의 효능

## <232> 배경, 목표 및 목적

<233> 박테리아는 proprietary wet loop 기초 기술을 사용하거나 보다 현대화된 (및 효과적인) 극세사계 천(microfbfibre-based cloths)을 사용하여 표면으로부터 거의 대부분 제거된다. 초극세사(ultramicrofbfibre)-기초 천들(UMF)은 단단한 표면으로부터 박테리아를 제거함에 있어서 특히 효과적이다. 이들 천들은 세제를 함유하지 않은 물과 함께 최적의 상태로 작용한다. 병원 환경에서 사용 후 이러한 천들은 병원 감염에 대해 책임이 있는 것으로 알려진 것의 적어도 일부인 10억개(billion)가 아니더라도 100만개의 생존 가능한 유기체(viable organism)를 함유하고 있기 때문에 생물학적 위험 물질(biohazard)로 표현된다. 이들 천들은 물로 축축해졌을 때 효과적으로 작용하기 때문에 우리는 CuWB50, CuAL42 및 CuPC33을 물에 추가하는 것이 이 천들에 의해 포착되는 이들 유기체의 생존력을 감소시키거나 제거하는지 여부를 조사하였다.

## <234> 재료 및 방법

<235> 잘려진 표면들(laminated surfaces)에

<236> 100 제곱 센티미터 영역에 걸쳐 무균 플랫 스프래더로 펼쳐져서 건조된 적절한 농도의 MRSA, Acinetobacter, 또는 Clostridium difficile spores를 포함한 완충 살린(buffered saline)을 접종하였다. 상기 영역은 살아있는 생존가능한 병원성 미생물의 충분한 침전을 보장하기 위해 컨택트 플레이트(contact plated)되었다. 그런 다음 상기 영역은 각각의 구리 조성물을 최종 농도 75ppm으로 하여 젖은 상태의 권고되는 제한에 따라 축축하게 한 초극미세 섬유(UMF)로 닦아진다. 그런 다음 상기 영역은 UMF에 의한 이노클럼의 제거를 평가하기 위해 다시 컨택트 플레이트되었다. 그런 다음 UMF는 세탁물까지의 여행을 시뮬레이트하기 위하여 미니-그립 백에 넣어져 실온에서 16시간동안 방치하였다. 16시간 후에 상기 UMF는 100ml 포스페이트 버퍼에 넣어졌고 Stomacher(섬유 및 식료품으로부터 생존가능한 미생물을 방출시키기 위해 고안된 기기임)에서 3분 동안 250rpm의 속도에서 10분간 원심분리된 10ml의 용리액에서 그리고 블러드 아가 위에 배양된 침전물(deposit)에서 행해졌다. 보드의 백그라운드 카운트(backgroun count of the boards) 및 PBS의 카운트는 어느 환경적 오염에 대하여 테스트되었다. 이러한 결과는 하기의 표16에 제시되어 있다.

&lt;237&gt;

표 16.

Compound/organism	Contact plates (expressed as number of bacteria recovered)		Stomacher eluent from UMF/Cu after 16hr @ RT	Board surface control*	PBS control**	Inoculum used per 100 Sq. cm
	Pre- Clean	Post- clean				
<b>CuAL42</b>						
MRSA	>500	0	6.6 X 10 <sup>2</sup>	0	0	2 X 10 <sup>5</sup>
ACCB	>500	0	0	0	0	2 x 10 <sup>5</sup>
CD spores	>500	0	0	0	0	3 x 10 <sup>5</sup>
<b>CuPC33</b>						
MRSA	>500	0	6.6 X 10 <sup>2</sup>	0	0	2 X 10 <sup>5</sup>
ACCB	>500	0	0	0	0	2 x 10 <sup>5</sup>
CD spores	>500	0	0	0	0	3 x 10 <sup>5</sup>
<b>CuWB50</b>						
MRSA	>500	0	3.3 X 10 <sup>2</sup>	0	0	2 X 10 <sup>5</sup>
ACCB	>500	0	0	0	0	2 x 10 <sup>5</sup>
CD spores	>500	0	0	0	0	3 x 10 <sup>5</sup>
<b>Control UMF</b>						
MRSA			2 X 10 <sup>5</sup>			
ACCB			2 x 10 <sup>5</sup>			
CD spores			3 x 10 <sup>5</sup>			

&lt;238&gt;

결론

&lt;240&gt;

컨택트 플레이팅(contact plating)은 UMF에 의해 효과적으로 제거된 생존가능한 이노클럼을 보여주었다. *Acinetobacter* 및 *C. difficile* spores에 대한 완전한 사멸 및 MRSA에 대한 네 개의 로그 퀄(99.99%)이 세 개의 구리 조성물 모두에 의해 16시간 시간 프레임 안에서 행해졌다. 아시네토박터(*Acinetobacter*) 또는 클로스트리듐 디피실리(*C. difficile*) UMF-Cu 천(cloths)로부터의 용리액의 원심분리된 침전물로부터 회수될 수 있는 박테리아는 없었다. 이러한 예는 75 ppm로 존재하는 모든 3개의 구리 화합물이 NHS에 걸쳐 평가되고 진행되고 있는 천 세탁 기술과 관련하여 살생제로 매우 효과적임을 보여준다. 반면, 다른 살생제(예컨대, 4급 암모늄, 할라이드 등)는 본문에서 동등하게 효과적이다. 환경에 대한 이유를 제외하고 최근 동향은 보다 안전한 대체물을 요구하게 되었다. 이하에서의 실험결과는 구리 메탈로-이온 조성물이 이러한 대안을 제공할 수 있다는 전제를 입증해줄 것이다.

&lt;241&gt;

실시예 12

&lt;242&gt;

#### H. 파이로리(*pylori*)에 대한 구리 항균제 CuAL42 및 CuPC33 의 효능

&lt;243&gt;

본 실시예에서는 균주 NCTC CagA 양성(positive), NCTC CagA 음성(negative) 및 AACTC J5 (게놈 시퀀스 알려짐)를 사용하여 표준 NCCLS 방법이 테스트로 사용되었다. 임상 검체에서 분리된 것은 UK1 메트로니다졸 내성이었으며, B1 클래리스로마이신 내성이었다. 밀리리터당 log 7 cfu/ml 집락형성단위(colony forming units per millilitre)의 최종 이노클럼을 사용하였다.

&lt;244&gt;

본 방법에서는 15, 30, 60 및 120 분에서 샘플링하여 항균제 0.5, 1.0, 5.0 및 12 ppm 농도에서의 표준 사멸곡선(kill-curve)을 얻었다.

&lt;245&gt;

사용된 중화액은  $1/4$  렁거젖산액이었다. 정량화에서는, 십진 희석하여 플레이트에 100 마이크로리터 놓았다. 상기 플레이트는 5일 동안 37°C에서 대기중에 배양하였으며, CampyGen에 의해 제조된 것이다.

&lt;246&gt;

결과:

&lt;247&gt;

도 10 내지 14에 나타난 바와 같이, CuAL42 는 CuPC33에 비해 보다 더 활성이 있었다. CuAL42 5 ppm 농도에서 120분 이상 동안 생균수가 5 내지 6 log로 감소하였다. CuAL42 12 ppm 농도에서는 30 분 이내에 생균수가 5 내지 6 log로 감소하였으며, 60 내지 120 분 이내에서는 더 이상 성장하지 않았다. cagA 상태나 메트로니다졸 또는 클래리스로마이신에 내성이 것도 상기 두 개의 구리 금속-이온 조성물의 효능에 영향을 미치지 않았다.

&lt;248&gt;

실시예 13

&lt;249&gt;

#### 핸드 젤 잔기(hand gel residues)의 Anti-MRSA 활성

&lt;250&gt;

방법: 핸드 젤을 적층 표면 보드(laminate surface boards)에 10cm<sup>2</sup> 당 1 ml로 펴바르고, 실온에서 밤새 건조시켰다. PBS ( $10^6$  CFU/ml)에 혼탁된 MRSA 0.1 ml를 10 cm<sup>2</sup>의 표시한 부분(각 핸드 젤 잔기에 대한 각각의 시점에

대해 1 스퀘어)에 조심스럽게 바르고, 10분 동안 건조시켰다. 상기 스퀘어는 즉시 접촉-플레이트(contact-plated)( $t = 0$  시간)되고, 최대 24 시간 내의 다양한 시점에 대해 접촉-플레이트되었다. 상기 접촉 배양 접시는 24 시간동안 배양되고, 접락형성단위(CFUs)을 계측하였다.

**<251>** **결과:** 도 20에 나타난 바와 같이, Xgel 잔기에 대해서는 어느 시점이든 CFUs가 없었으며, 이는 잔기 내에 CuAL42 의 존재로 인한 것으로 추측된다. 반대로, 시간-의존 경향의 감소에도 불구하고 Purell 잔기에서는 최대 3 시간내의 어느 시점이든지 CFUs 가 검출되었으며, 이로부터 잔기 내의 방부제 또는 다른 성분은 적당한(modest) 항균성 활성을 갖는 것을 알 수 있다. 또한 Purell 잔기 내의 알코올은 밤새 건조 기간동안 소실되었기 때문에 알코올의 존재에 기인한 것이라고 할 수 없다.

**<252>** **결론:** 상기 Xgel 잔기는 모든 시점에서 MRSA의 생존 및 성장을 방지하였다. 반면, Purell 잔기는 최소 3 시간 동안 MRSA의 생존을 유지시켰다. NHS에 의해 1리터의 Purell은 1 개월당 침대 하나에 사용된다고 평가될 수 있다. 왜냐하면 1리터의 Purell은 70% 알코올을 함유하고, 약 300 ml의 잔기가 매 월당 각각의 침대에 잔류하며, 이로 인해 MRSA의 생존을 잠재적으로 유지시켜 줄 수 있기 때문이다(또한 예비적 결과도 항생제 내성의 아시네토박ter 균주와 유사한 결과를 나타냄). 반대로, Xgel 잔기는 MRSA의 생존을 유지하지 않았으며(또는 아시네토박ter- 예비적 결과), 따라서 헬쓰 케어 세팅에서 박테리아의 성장 및 생존을 방지하는 데에 도움이 될 것이다.

#### <253> 실시예 14

##### <254> 3종의 구리 조성물 75 ppm에 의한 MRSA-오염된 UMF 천(cloth)의 소독

**방법:** PBS 내의 MRSA ( $2 \times 10^6$ )를 적층 표면 보드(laminate surface boards)  $50 \text{ cm}^2$ 에 펴바르고, 10분 동안 건조시켰다. 한 스퀘어를 울트라마이크로파이버(UMF) 천으로 즉시 닦아 내고, 스토머크(stomached) 및 플레이트(plated)되었으며, 접락형성단위(CFUs)을 24 시간 후에 계측하여 이노클럼이 맞는지, 그리고 상기 이노클럼이 UMF 천에 완전히 빨아들여졌는지 확인하였다. 다른 보드(boards)는 물에 젖은 표준 UMF 또는 3종의 구리 조성물 75 ppm을 함유하는 물에 젖은 UMF로 닦았다. 상기 오염된 UMF를 플라스틱 가방에 16 시간 방치하고, 스토머크(stomached) 및 플레이트(plated)되었으며, 접락형성단위(CFUs)을 24 시간 후에 계측하였다.

**<255>** **결과:** 도 21에 나타난 바와 같이, MRSA 박테리아 모두를 빨아들인 UMF 천을 나타내는 이노클럼 표준은  $2 \times 10^6$  CFUs를 함유하였다. 물만으로 적시고, 16 시간 동안 방치한 표준 UMF 천은  $1 \times 10^6$  MRSA를 함유한 반면, 3종의 구리 조성물에 적신 UMF 천은 16 시간 동안 방치한 이후에도 생존한 박테리아가 없었다.

**<256>** **결론:** 이러한 결과는 MRSA를 병원에서 사용되는 적층 표면(laminate surfaces)으로부터 제거하는 데에 매우 효과적인 것을 나타낸다. 그러나, UMF 천에서 박테리아의 생존은 매우 쉬우며, 이러한 천의 처분이나 세탁은 생존한 박테리아를 여기저기에 전이시키는 위험을 초래한다. 따라서, 구리 화합물로 적신 UMF 천이 16 시간 이후에도 살아있는 MRSA 가 존재하지 않는다는 사실은 매우 중요하다. 이러한 100% 효능의 3 종의 구리 조성물로 오염을 제거하는 것은 병원 및 표면으로부터 잠재적으로 위험한 박테리아를 제거해야할 필요성이 있는 곳에 매우 유용하게 사용될 수 있다.

#### <257> 실시예 15

##### <258> A431 인간 피부 세포주에 대한 핸드 젤 세포독성

**방법:** 인간 편평 상피 세포주 A431을  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  대기압 가습 인큐베이터 내의  $75 \text{ cm}^2$  조직 배양 플라스크에서 10% FCS, 2 g/L 탄산수소나트륨 및 2 mM L-글루타민 (완전 배지, complete medium)을 포함하는 RPMI 1640 배지에 배양하였다. 세포독성 실험의 경우, A431 세포를 편평한 바닥의 96 well 플레이트에 well 당 200  $\mu\text{l}$  완전 배지의  $5 \times 10^4$  세포를 놓고, 배양기 바닥 전체가 덮이도록 성장시켰다. 실험하는 날, 고갈된 배양 배지로부터 가스를 흡출하고, 100  $\mu\text{l}$  의 후레쉬 완전 배지로 대체하였다. 핸드 젤의 샘플을 완전 배지(complete medium)에 희석하여 도면에 나타난 바와 같이 농도를 2 배로 하고, 100  $\mu\text{l}$  의 각 샘플을 상기 세포에 가한 후, 24 시간동안 더 배양하였다. 현미경으로 검사한 후, 상기 세포를 고정 및 스테인(stained)하여 세포독성을 하기와 같이 정량 분석하였다. 설포로다민(sulforhodamine) B (SRB) 세포독성을 분석하고 국립 암 연구소에서 확인하였다. 요약하면, 상기 세포를 RPMI 배지 (no FCS)로 2회 세척하고, 10% 트리클로로아세트산으로 1 시간 동안  $4^\circ\text{C}$ 에서 고정하였다. 수돗물로 2회 세척한 후, 상기 세포를 SRB (1% 아세트산에 용해된 0.4% w/v SRB) 으로 실온에서 30 분 동안 스테인(stained)되었다. 다시 수돗물로 2회 세척한 후, 남아있는 스테인(stain)은 10 mM Tris base에 용해시키고, wells의 흡광도(optical density, O. D.)를 Dynatech Multiplate ELISA 리더기로 540 nm에서 측정

하였다. 생존 세포 퍼센트는 test O. D.를 표준 O. D.로 나누 후, 100을 곱하여 산출하였다.

**<261>** 결과: 도 22에 나타난 바와 같이, Xgel 베이스(잔탄검과 시트르 산이 농화제로 함유된 Aloe vera 젤)는 어떠한 농도에서든 A431 세포 생존에 뚜렷한 영향이 없었다. Xgel은 비알코올성 핸드 젤이며, Xgel 베이스와 314 ppm의 CuAL42 및 구리계 살생제(biocide)로 이루어진다; 상기 제품은 세포 생존을 최대 농도에서 약 25 %로 감소시키지만, 그 이하의 농도에서는 효과가 없었다. 10% 에탄올은 A431 세포 생존을 약 50%로 감소시키지만, 낮은 농도에서는 거의 효과가 없었다. Purell은 알코올계 핸드 젤이며, 현재 병원에서 손 소독을 위해 사용되고 있다. Purell은 62% 변성 알코올과 이소프로필 미리스테이트, 프로필렌 글리콜, 토코페릴 아세테이트, 암모노메틸 프로파놀을 함유하며, 10 % 농도에서 A431 세포를 95 % 이상 사멸시키나, 역시 낮은 농도에서는 거의 효과가 없다. 스피리겔(Spirigel) 및 소프탈린드(Softalind)는 또한 알코올 함유 핸드 젤이지만, 스피리겔은 Purell과 유사한 프로파일을 갖는 반면, 소프탈린드는 단지 1 %의 농도에서도 약 50 %의 A431 세포를 사멸시킨다. 그러나, 소프탈린드는 변성알코올과 프로파놀의 혼합물 뿐만 아니라, PEG-6 caprylic/capric 글리세라이드 및 디이소프로필 아디페이트을 포함하고 있어, A431 세포에 보다 더 독성을 나타낸 것으로 예상된다. 넥산(Nexan)은 0.2% 트리클로란(triclosan)과 세제를 함유하는 핸드 젤로서, 치명적인 세포독성을 나타내며, A431 세포를 테스트한 모든 농도에서 사멸시켰다. 고농도에서(#), 넥산은 실제로 A431 세포를 용해시키며(현미경 관찰), 세제에 기인한 효과라고 생각된다. 결과적으로, 4급 암모늄 화합물을 함유하는 상기 2개의 클리닝제 CBC 및 Activ8는 A431 세포에 대해 강한 세포 독성을 나타낸다. 고농도에서는 (\*) 이러한 제품들은 죽은 A431 세포를 플라스틱 플레이트에 부착시켜(현미경 관찰) 세포 재생(survival)을 증가시키는 나쁜 영향을 미쳤다.

**<262>** 결론: 상기 결과로부터 알코올 함유 핸드 젤은 배양액에서 A431 피부 상피 세포에 적당한(modest) 세포 독성 효과를 갖는 것을 알 수 있다. 그러나 이러한 세포 독성 효과는 상기 제품이 헬쓰 케어 스탠드에 의해 손에 사용되는 1/10<sup>th</sup> 또는 그 이하의 농도에서 나타나며, 예컨대 Purell은 매일 자주 사용할 경우, 피부 건조 및 갈라짐을 유발하는 것을 알 수 있다.

**<263>** Xgel은 또한 1/10<sup>th</sup> 노르말 강도(normal strength)에서 매우 적당한 세포독성을 나타내며, 이는 Purell 1/33<sup>rd</sup> 노르말 강도(normal strength)에서와 거의 동일한 효과이며, Xgel 베이스는 어떠한 농도에서든 A431 세포에 대한 영향이 없으므로 이러한 효과는 CuAL42 살생제의 존재에 기인한 것으로 생각된다. 이러한 결과는 Xgel이 Purell에 비해 피부에 더 적절한 것을 나타낸다. 또한 다른 연구에 따르면, Xgel은 Purell에 비해 MRSA, 항균제 내성의 아시네토박ter 및 클로스트리듐 디피실리균을 사멸하는 데에 상당히 더 효과적이라고 나타난 바 있다. 실제로 Purell은 클로스트리듐 디피실리균에 대해 거의 비효율적이다. 치명적인 설사(diarrhoea)를 유발하는 이러한 박테리아균은 MRSA 보다 병원에서 사망의 더 큰 원인이 되고 있으므로 Purell 보다 Xgel를 사용하는 것은 보다 논리적인 선택이 될 수 있다.

**<264>** 넥산은 0.2% 트리클로란(triclosan)과 세제를 함유하며, 테스트한 모든 농도에서 A431 세포를 사멸시켰다. 놀랍게도, 넥산은 이태리 병원에서 헬쓰 케어 스탠드에 의해 표준 핸드 젤로 사용되고 있다. 4급 암모늄 화합물을 활성 성분으로 포함하는 상기 2개의 클리닝 제품 CBC 및 Activ8은 A431 세포에 대해 매우 세포독성을 보이지만, 이러한 제품은 고무 장갑을 끼는 사람들에 의해 사용되고 있어, 스킨 문제를 일으키지는 않을 것이다.

**<265>** 실시예 16

**<266>** 병원 감염으로부터 분리된 서로 다른 박테리아종에 대한 3종의 구리 조성물의 감염성의 측정

**<267>** 목적: 장내세균과(Enterobacteriaceae), 수도모나스(Pseudomonads), 스타필로코시(Staphylococci) 및 엔테로코시(Enterococci)와 같은 박테리아 범위에 대한 3종의 구리 조성물의 활성 측정.

**<268>** 요약

**<269>** 총 170의 서로 다른 분리된 박테리아(22 아시네토박ter, 18 Enterobacter, 27 Klebsiella, 26 Enterococci, 10 Pseudomonas, 37 Serratia and 45 Staphylococci)를 MIC 측정기를 사용하여 3종의 구리 화합물에 대한 감염성을 측정하였다. Zone 크기는 11-31 mm로 변경하여 측정한 결과, resistance 패턴이 나타나지 않았다.

**<270>** 물질

**<271>** 1) 여기서 사용된 구리 화합물은 다음과 같이 표시였다: 표 1의 구체예 1 내지 8로부터 얻은 CuAL42, CuWB50 및 CuPC33

<272> 2) Isosensitest agar (ISO Agar)

<273> 3) Isosensitest broth (ISO broth)

<274> 4) 항균제 감염성 테스트 디스크 (OXOID CT0998B)

<275> 5) 가게에서 구입한 살균 면봉(Sterile swabs)

<276> 6) 박테리아 배양액의 밤새 성장

<277> 방법

<278> 항균제 감염성 테스트 디스크(OXOID CT0998B)를 상기 각각의 구리 조성을 20u1로 포화시키고, 핫 에어오븐에서 2 시간 동안 각각 건조시켜 4°C에서 저장하였다.

<279> 박테리아 배양액을 적절한 배지(nutrient agar or MacConkey)에 접종하고 밤새 인큐베이트하였다. 5 well-분리된 콜로니를 루프(loop)로 접촉시켜 5ml의 Isosensitest broth에 접종하였다. 상기 broth를 36 °C-/+ 20 °C에서 호기성에서 밤새 인큐베이트하였다. 상기 broth를 볼텍스(vortex)하고 다음과 같이 배양액의 "x" drops을 긴 플라스틱 피스토리 피펫으로부터 5 ml ISO broth으로 피펫하여 이노큘럼을 제조하였다:

<280> Enterobacteriaceae 1 drop

<281> Pseudomonas 1 drop

<282> Enterococci 5 drops

<283> Staphylococci 2 drops

<284> 살균 면봉을 상기 볼텍스한 이노큘럼 suspension에 담그고, 튜브의 벽에 누른 다음, 과잉 용액을 제거하기 위해 회전시켰다. 상기 플레이트는 로타리 플레이터로 접종하였다. 살균 접게를 사용하여, 디스크를 플레이트에 놓아 agar에 완전히 접하도록 하였다. 적용한 디스크는 제거하지 않았다.

<285> 리딩

<286> 상기 화합물에 의해 성장이 방해된 방해(inhibition) 구역을 측정하였다.

<287> 결과를 하기와 같이 기록하였다.

<288> A = CuAL42

<289> B = CuWB50

<290> C = CuPC33

<291> 구역(Zone) 크기는 mm 이다.

<292> 결과.

&lt;293&gt;

황색 포도상 구균(*Staphylococcus aureus*)

		A	B	C
<b>EMRSA-15</b>				
H040220409	E15 B1	26	22	23
H040220408	E15 B3	27	22	22
H040340351	E15 B3	26	26	26
H061500550	E15 B5	27	25	27
H061500522	E15 B7	31	25	27
H061440332	E15 B1	30	27	27
H061520148	E15 B17	22	22	19
H061520592	E15 B8	24	25	25
H061780511	E15 B1	20	17	18
H061780562	E15 B2	30	27	25
H061880414	E15 B3	20	19	19
H062040630	E15 B3	24	20	21
<b>EMRSA-16</b>				
H045180281	E16A1	30	28	25
H040220405	E16 A16	25	22	21
H053000200	E16 A14	25	22	21
H055140586	E16A12	23	21	20
H060620616	E16 A16	24	22	20
H060620609	E16 A2	22	22	23
H060780341	E16 A11	22	22	19
H061620087	E16 A7	24	22	20
H061700478	E16 A29	27	22	19
H060780344	E16A1	21	21	21
H060440423	E16A14	23	22	20
H060200417	E16 A16	20	19	18
<b>EMRSA-1</b>				
H043980582	GOS	26	26	26
<b>EMRSA-17</b>				
H041940150	S'hampton	26	26	26
H053100245	S'hampton	26	26	25
<b>Irish-1</b>				
H042280049	Belfast	25	25	25
H054360295	Craigavon	25	24	22

&lt;294&gt;

**Irish-2**

H052080391 Craigavon	27	26	24
----------------------	----	----	----

**CA-MRSA**

H043880199 ST1 PVL-	25	24	22
H060180184 ST5 PVL+	25	25	25
H045260142 ST8 PVL+	27	24	22
H044300316 ST22 PVL+	22	19	17
H060640427 ST30 PVL+	27	25	24
H060660187 ST59 PVL+	24	23	22
H054960270 ST80 PVL+	25	25	25
H052320141 ST88 PVL+	25	25	25

**MSSAs**

55/3488 80/81; PVL+	27	27	26
H051680084 Distinct	26	25	22
H051760098 Group II MSSA	24	24	23
H051660517 Group II MSSA	24	24	24
H051260160 Group II MSSA	27	24	25
H051640376 WSS-96	27	27	26
H052260557 Dis PVL+	27	25	24
H060940449 NT PVL+	26	22	12

<i>Enterococcus faecium</i>	VRE	VSE	A	B	C
H062940352	POS	NEG	29	28	31
H062940351	POS	NEG	25	22	21
H062760230	POS	NEG	32	28	30
H062920531	POS	NEG	27	26	25
H062940372	POS	NEG	26	24	25
H063000437	NEG	POS	27	27	28
H063000438	NEG	POS	27	24	29
H062740365			30	26	25
H062980090			31	27	33
H062940548			32	29	31
H062940550			28	24	27
H062940547			29	24	26
H062940549			28	24	26
H062940322			30	25	29
H062980250			30	27	28
<i>Enterococcus faecalis</i>					
H0630004390	NEG	POS	27	27	28
H062980583	POS	NEG	29	27	29
H062380292	NEG	POS	24	23	26
H062960351			30	27	30
H062960251			30	28	32
<i>Enterococcus gallinarum</i>					
H062980247			29	31	29
<i>Enterobacter cloacae</i>	A	B	C		
H062680089	17	16	20		
H062760216	19	18	19		

H062820406	17	14	20
H062880482	15	11	18
H062920526	14	11	13
H062920437	23	19	25
Outbreak strains			
Queen Elizabeth Hospital Gateshead		QUEE09EB-1	
H050760267	19	16	18
H043820094	16	15	19
H043820095	17	17	20
H043820096	18	17	19
H050760271	17	16	20
St Georges Hospital HEB5			
H0961460503	16	15	15
H061460504	16	15	15
H042360326	14	14	13
H042360328	13	13	17
H042360329	16	15	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	A	B	C
Outbreak strains HKL83 Liverpool			
H061720323	19	16	25
H061720324	17	17	24
H061760360	18	17	22
H061760361	17	20	22
H061760362	18	18	17
H061760363	17	16	20
H061400267	18	17	23
H062020317	18	17	24
H061480383	18	17	17
H061480364	18	18	18
H061120437	17	15	22
H061120438	16	15	23
H061120439	15	16	22
Routine strains			
H062840595	12	12	15
H062840614	15	13	17
H062840675	12	13	17
H062860495	14	13	16
H062880408	12	12	17
H062880414	14	13	17
H062880489	12	12	15
H062900312	14	12	11
H062920527	11	13	16
H062920528	11	12	16
H062920529	13	15	17
H062920530	13	14	15
H062920245	15	14	14
H062920257	12	14	14

*Pseudomonas aeruginosa* Outbreak Strains HPA86 St Georges Hospital

	A	B	C
H062880427	20	17	25

H062880428	17	17	23
H062680429	17	17	23
H061820407	20	18	24
H061420408	18	16	21
H062500552	21	18	24
H062500553	19	17	23
H053940608	20	17	24
H053940608	20	17	24
H053940609	18	17	23

*Serratia marcesens* Outbreak Strains St, Mary's Neonatal Unit

	A	B	C
H062880311	19	17	24
H062880312	18	18	20
H062880313	20	18	20
H062880314	20	18	23
H062880315	19	18	20
H062880316	20	18	20
H062880317	20	22	20

*Acinetobacter baumannii*

	A	B	C	
A/3009	SE clone	22	20	23
H043260547	SE clone	22	20	22
H061340585	SE clone	18	18	21
A/3214	OXA-23 clone	20	16	22
H044640092	OXA-23 clone	20	20	23
H060800607	OXA-23 clone	19	18	20
H044220140	NW strain	21	21	27
H034940173	Tstrain	22	19	20
H052600376	Tstrain	20	19	22
H060560322	Tstrain	21	18	25
3/A/3311	Sporadic 1	17	14	19
H043860186	Midlands 2	16	13	17
H060980542	Sporadic 3	20	17	16
A/2875/1	W strain	11	11	13
RUH2034	W strain	13	11	16
H060800430	BUAC-1	12	11	12
H034560177	OXA-23 clone 2	11	10	12
H042220635	OXA-23 clone 2	11	11	12
H042900157	Sporadic 2	12	11	13
H041200198	24AC-1	22	20	23

&lt;297&gt;

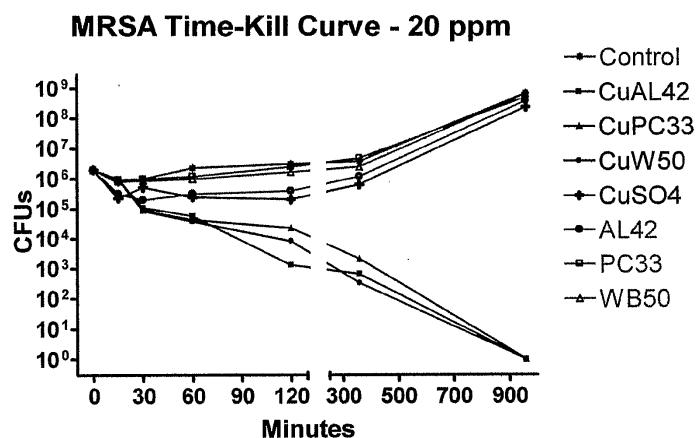
## 결 론

&lt;298&gt;

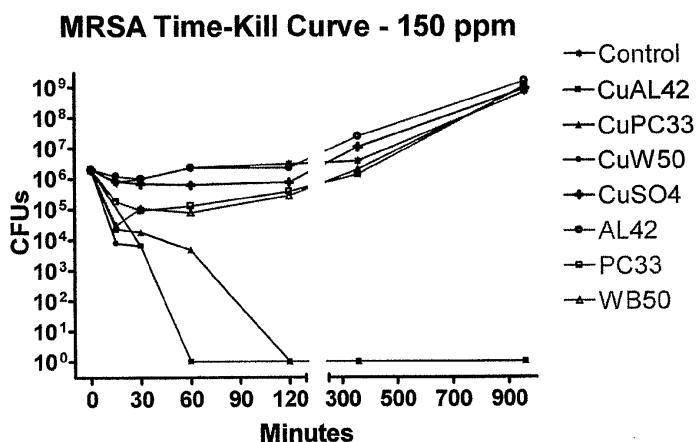
총 170 균주들, 22 아시네토박터, 18 Enterobacters, 27 Klebsiellas, 26 Enterococci, 10 Pseudomonas, 37 Serratias, 및 45 Staphylococci를 3종의 구리 화합물에 대하여 측정하였다. 저항(resistance)은 없었다. 구역(zone) 크기는 11-31 mm로 변경하였다.

## 도면

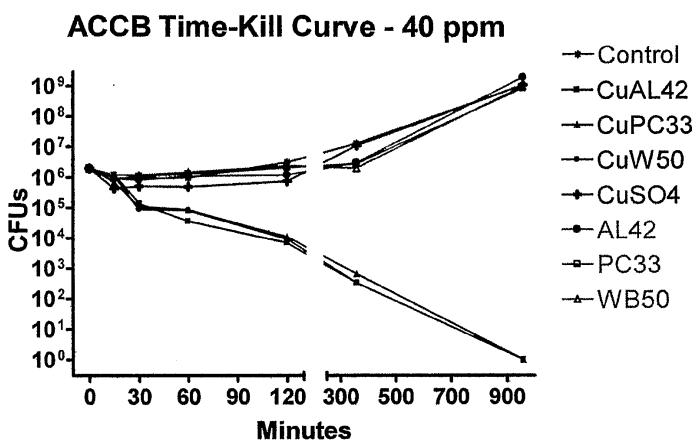
## 도면1



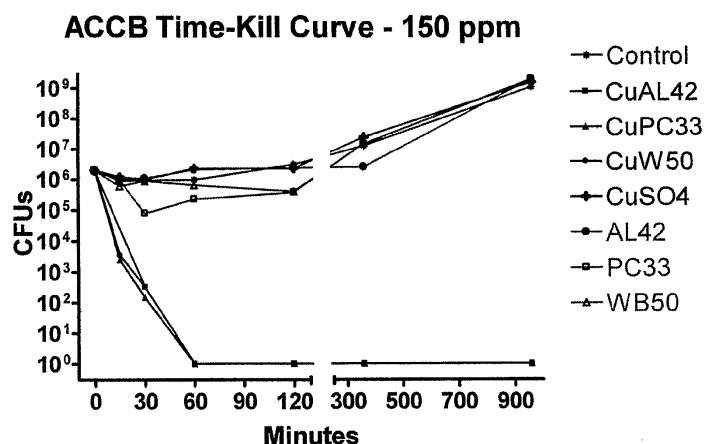
## 도면2



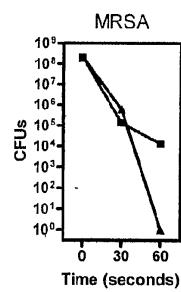
## 도면3



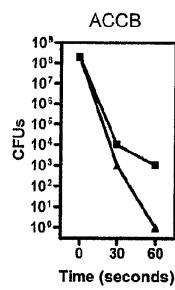
## 도면4



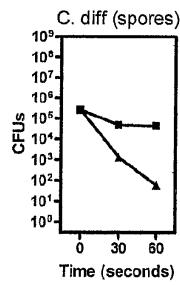
도면5



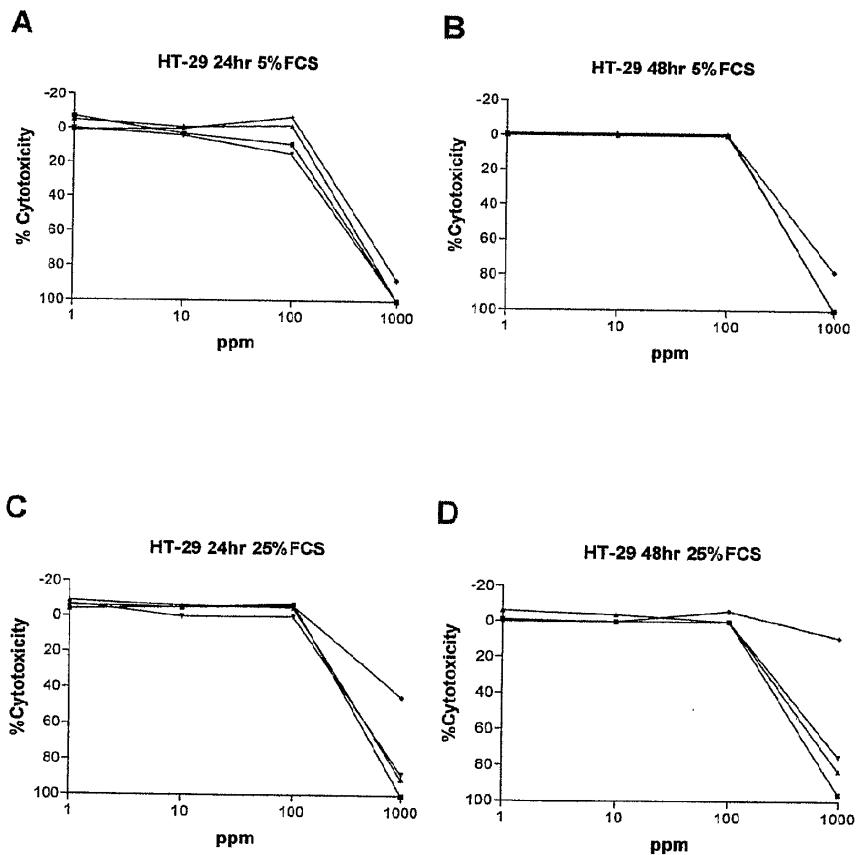
도면6



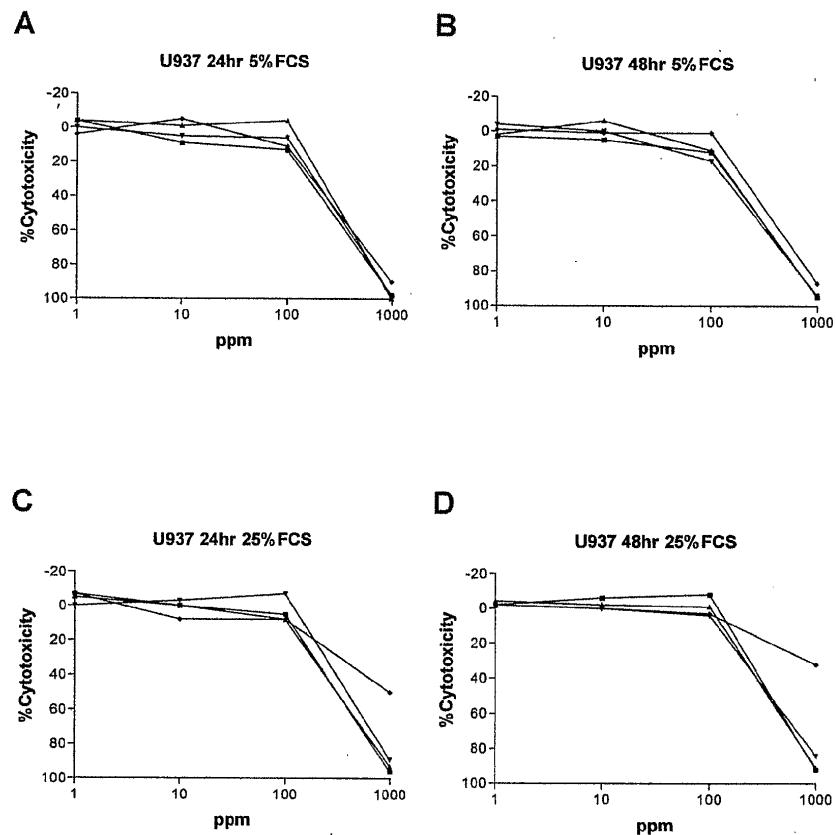
도면7



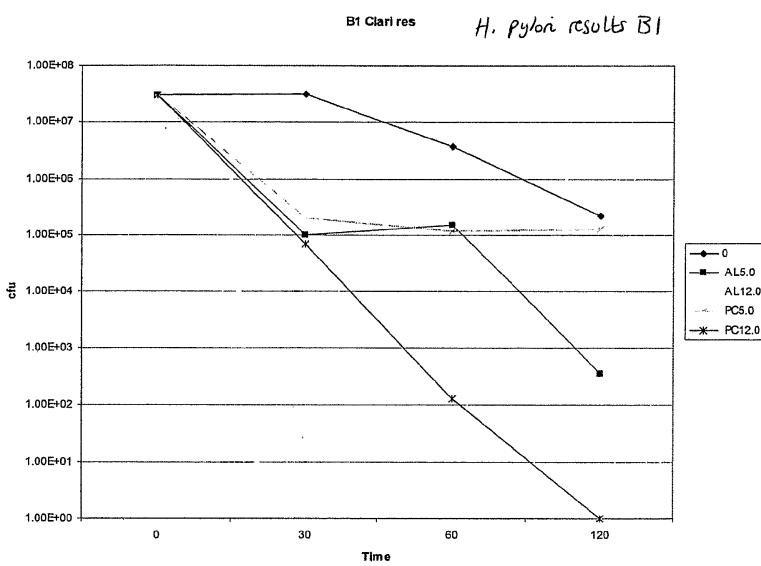
## 도면8



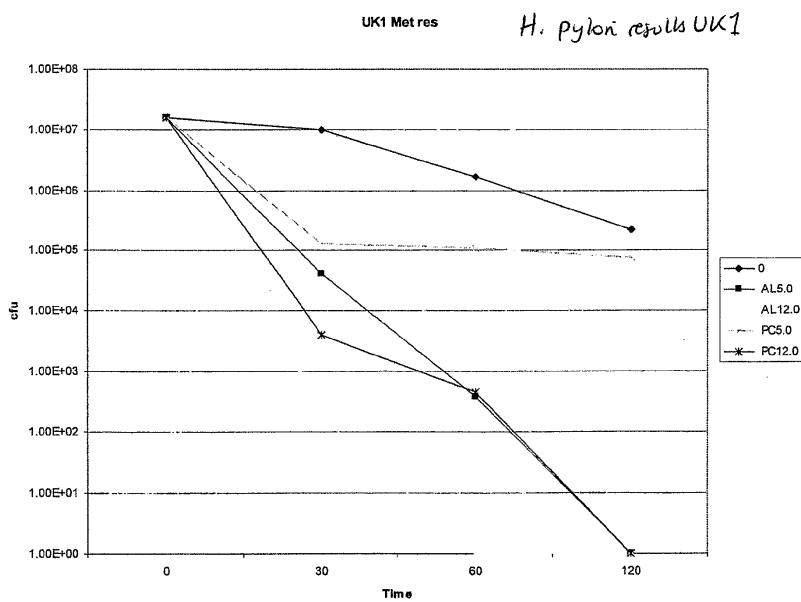
## 도면9



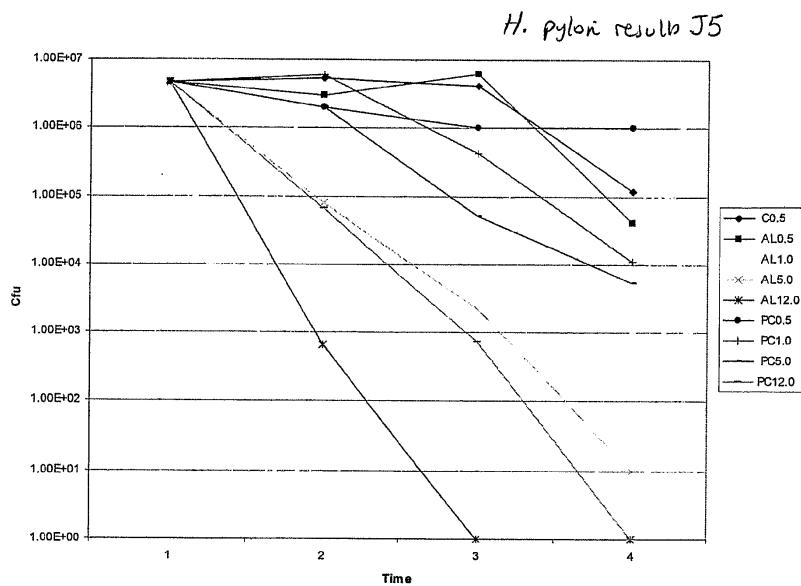
## 도면10



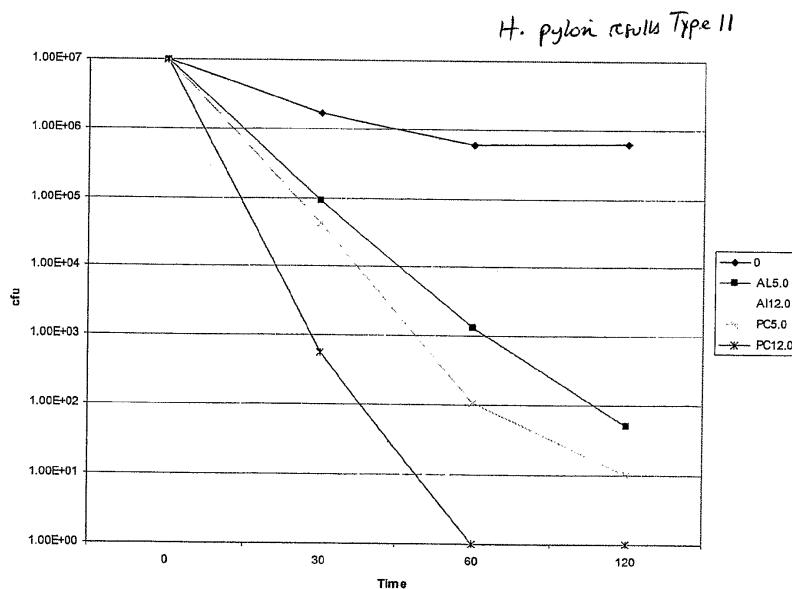
도면11



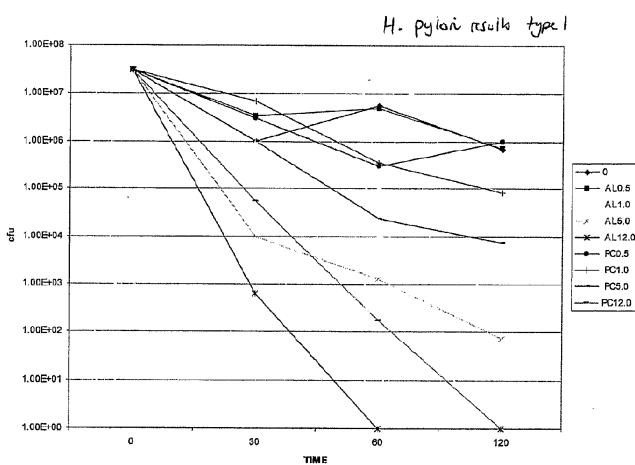
도면12



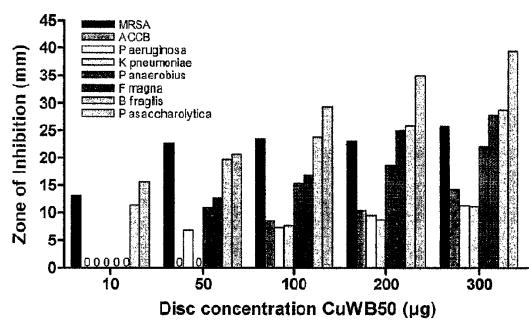
## 도면13



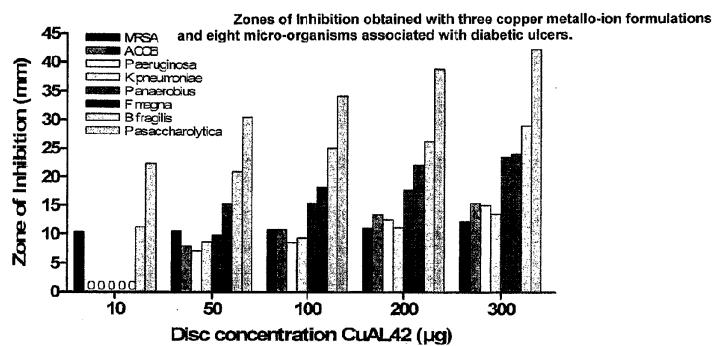
## 도면14



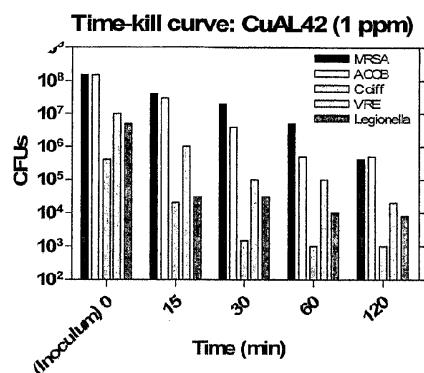
## 도면15



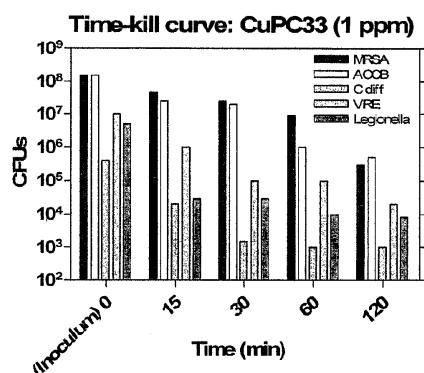
도면16



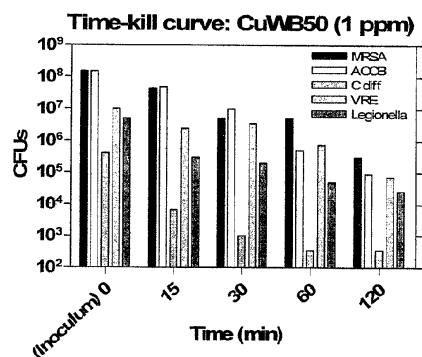
도면17



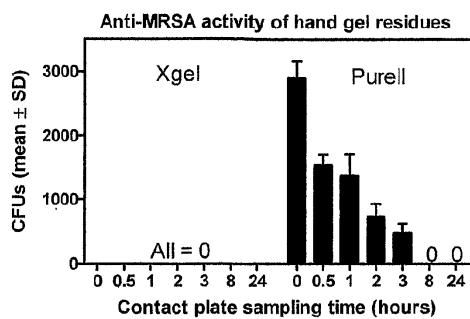
도면18



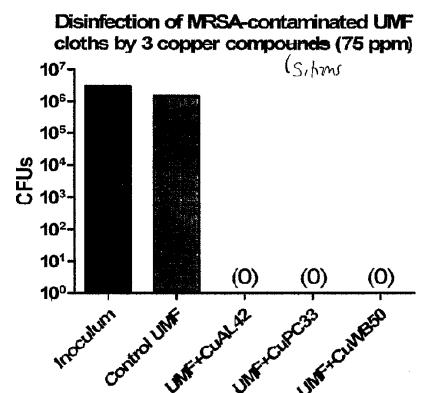
## 도면19



## 도면20



## 도면21



## 도면22

